

# Thema: 2-Methoxyestradiol als neue Substanz zur Behandlung solider Tumore

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. Guido Schumacher

geboren am 01.06.1963 in Bonn

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 12. Februar 2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A.H. Hölscher

2. Prof. Dr. med. H.P. Bruch

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Allgemeine Tumorproblematik	1
1.2. Epidemiologie	1
1.2.1. Genetische Faktoren	1
1.2.2. Umweltfaktoren	2
1.2.2.1. Rauchen	2
1.2.2.2. Alkohol	2
1.2.2.3. Diät	2
1.2.2.4. Infektionen	2
1.2.2.5. Sonnenexposition	2
1.2.2.6. Andere Ursachen	3
1.3. Onkogene und Tumorsuppressorgene	3
1.3.1. Zellmutationen	3
1.3.2. Onkogene	3
1.3.3. Tumorsuppressorgene	4
1.4. Zellzyklusregulatoren	5
1.4.1. Das Tumorsuppressorgen p53	5
1.4.2. Das Tumorsuppressorgen p21 <sup>WAF1</sup>	6
1.4.3. Die bcl-2 Familie	6
1.5. Solide Tumoren mit schlechter Prognose	7
1.5.1. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)	7
1.5.2. Das Pankreaskarzinom	8
1.5.3. Das Bronchialkarzinom	9
1.6. Neue Therapieansätze	11
1.6.1. Hepatozelluläres Karzinom	11

1.6.2. Pankreaskarzinom.....	11
1.6.3. Bronchialkarzinom.....	11
1.7.2-Methoxyestradiol (2-ME).....	12
<b>2. Zielsetzung.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1. Zelllinien.....	18
3.1.1. Pankreaskarzinomzellen.....	18
3.1.2. Zellen hepatozellulärer Karzinome.....	18
3.1.3. Bronchialkarzinomzellen.....	19
3.1.4. Normale humane Hepatozyten.....	19
3.2. Kultur und Proliferationsanalysen.....	20
3.2.1. Tumorzellen.....	20
3.2.2. Humane Hepatozyten.....	21
3.3. Therapeutische Substanzen.....	21
3.4. Western Blot Analysen.....	22
3.4.1. Aussaat der Zellen, Behandlung und Herstellung des Zelllysats.....	22
3.4.2. Messung der Proteinkonzentration.....	22
3.4.3. Gelelektrophorese und Proteintransfer.....	23
3.4.4. Sichtbarmachung der Proteinbanden.....	24
3.5. AST-Messung.....	26
3.6. Apoptosenachweis mittels Fluoreszenzfarbstoff.....	27

3.7. Immunzytologischer Apoptosenachweis.....	29
3.7.1. Immunfluoreszenz-Färbung.....	29
3.8. Zellzyklusanalysen.....	31
3.9. Tierversuche.....	34
3.9.1. Beschreibung und Haltung der Tiere.....	34
3.9.2. Hepatozelluläres Karzinom.....	34
3.9.3. Pankreaskarzinom.....	35
3.9.4. Bronchialkarzinom.....	36
3.9.5. Leberresektion zur Proliferationsuntersuchung.....	36
3.10. Immunhistochemie.....	37
3.10.1. Gefrierschnitte.....	37
3.10.2. Paraffinschnitte.....	38
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
4.1. 2-ME zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms.....	39
4.1.1. Wachstumshemmung durch 2-ME.....	39
4.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Kernmorphologie....	41
4.1.3. Immunzytologischer Apoptosenachweis.....	46
4.1.4. Messung der Zellschädigung mittels AST-Konzentrationen.....	51
4.1.5. Zellzyklusanalysen.....	52
4.1.6. Molekulare Veränderungen nach 2-ME-Gabe.....	55
4.1.7. Wirksamkeit von 2-ME in vivo.....	57
4.2. 2-ME zur Behandlung des Pankreaskarzinoms.....	59
4.2.1. p53 Mutationsstatus verschiedener Zelllinien.....	59
4.2.2. Wachstumshemmung durch 2-ME beim Pankreaskarzinom.....	59
4.2.3. Induktion von Apoptose und Veränderungen des Zellzyklus.....	61
durch 2-ME	
4.2.4. Apoptosenachweis durch immunzytologische TUNEL-Färbung.....	64

4.2.5. Wirksamkeit von 2-ME in vivo.....	66
4.2.6. Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Blutgefäße.....	67
4.2.7. Kombinationstherapie mit 2-ME und anderen Zytostatika.....	69
4.2.8. Apoptosenachweis nach Kombinationsbehandlung.....	71
4.3. 2-ME zur Behandlung des Bronchialkarzinoms.....	72
4.3.1. Kombination mit 2-ME und Gentherapie in vitro.....	72
4.3.2. Kombination mit 2-ME und Gentherapie in vivo.....	73
4.4. Wirkung von 2-ME auf multiresistente humane Zellen.....	78
4.4.1. Cisplatinresistente Bronchialkarzinomzellen.....	78
4.4.2. Multiresistente Pankreaskarzinomzellen.....	79
4.5. Toxizität von 2-ME in vivo.....	83
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>86</b>
5.1. Steroide und Tumorwachstum.....	86
5.2. Tumorhemmung durch 2-ME.....	86
5.3. Kombinationen mit 2-ME und anderen tumorhemmenden Substanzen.....	89
5.4. Wirkmechanismen von 2-ME auf Tumorzellen.....	91
5.4.1. Antiangiogenetischer Effekt.....	91
5.4.2. Hemmung der Mikrotubuli.....	92
5.4.3. Induktion von Apoptose und molekulare Veränderungen.....	92
5.4.4. Einfluß des p53.....	93
5.4.5. Einfluß des bcl-2.....	94
5.4.6. Zellzyklusarrest.....	96
5.4.7. Andere Mechanismen.....	97
5.5. Chemoresistenz und 2-ME.....	97

5.6. Wirksamkeit von 2-ME in vivo und Einschätzung der Toxizität.....	99
5.7. Tumorspezifität von 2-ME.....	99
5.8. Potentielles Risiko durch 2-ME.....	101
5.9. Klinischer Einsatz von 2-ME.....	101
5.9.1. Phase I Studie beim metastasierenden Mammakarzinom.....	102
5.9.2. Phase I Studie beim metastasierenden Mammakarzinom.....	103
in Kombination mit Docetaxel	
5.9.2.1. Ein- und Ausschlusskriterien.....	103
5.9.2.2. Behandlung mit Dosisescalationsschema.....	103
5.9.2.3. Beobachtete Nebenwirkungen.....	104
5.9.2.4. Metabolismus von 2-ME.....	105
5.9.2.5. Pharmakokinetik von 2-ME.....	105
5.9.2.6. Klinische Wirkung auf das Tumorwachstum.....	105
5.9.2.7. Schlussfolgerung.....	106
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
<b>Literatur.....</b>	<b>110</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>123</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeinen Tumorproblematik

Die erfolgreiche Therapie eines Tumorpatienten bezieht eine Vielzahl verschiedener klinischer Disziplinen ein. So sollte die Therapieplanung und –durchführung stets in Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Fachdisziplinen erfolgen. Durch die Entwicklung neuer zusätzlicher Therapieverfahren wie moderne Bestrahlungsregime oder neue Chemotherpieregime und nicht zuletzt durch moderne Operationstechniken wird die Behandlung zunehmend komplexer und für den Einzelnen unüberschaubarer. Somit gibt es in der Therapie auch zunehmende Überschneidungen zwischen den verschiedenen Disziplinen. Die Indikationsstellung zur geeigneten Therapie sollte demnach auch zunehmend interdisziplinär erfolgen. So zum Beispiel beim zentralen Gallengangskarzinom, das im Einzelfall nach einem multimodalen Therapiekonzept behandelt wird. Durch Embolisierung der rechten Leberarterie wird ein Reiz zur Proliferation des linken Leberlappens gesetzt, so daß dann wenige Wochen danach eine Resektion des rechten Leberlappens durchgeführt werden kann. Interdisziplinär ist auch die Behandlung des Rektumkarzinoms, was neben der Operation eine neoadjuvante Radiochemotherapie erfährt. Interdisziplinäre Kooperation ist auch erforderlich zur Durchführung von intraoperativer Bestrahlung oder adjuvanter Chemotherapie. Diese Entwicklung zur multidisziplinären Behandlung führt zu hoher Kompetenz und optimaler Versorgung der Patienten und sollte weiter ausgebaut werden.

## 1.2 Epidemiologie

1990 wurden weltweit ca. 7,8 Millionen Fälle von malignen Tumoren diagnostiziert. Die Anzahl neuer Fälle verdoppelte sich von 1970 bis 2001. Viele Faktoren sind bei der Tumorentstehung von Bedeutung.

### 1.2.1. Genetische Faktoren

Die meisten Tumoren besitzen genetische Mutationen. Man vermutet, daß Veränderungen des Erbgutes in somatischen Zellen die Basis für die maligne Entartung sind. Dazu gehört auch die dominant vererbte Empfänglichkeit für jeden

Tumortyp. Diese Tumoren machen ca. 2-5% aller letalen Tumorerkrankungen aus. Es gibt Hinweise, daß die genetische Disposition durch Umwelteinflüsse aggraviert wird.

### 1.2.2. Umweltfaktoren

Die Inzidenz vieler Tumoren variiert stark zwischen geographischen Gebieten. Man schätzt, daß Umweltfaktoren für über 80% der Entstehung von Tumoren verantwortlich sind (Doll et al. 1981).

#### 1.2.2.1. Rauchen

Tabakkonsum ist die größte vermeidbare Ursache eines frühzeitigen Todes durch maligne Tumoren. Man schätzt, daß 15% (1,1 Millionen neue Fälle pro Jahr) aller Tumoren in mehr oder weniger direktem Zusammenhang mit der Rauchgewohnheit stehen. In Regionen, in denen Männer mehrere Decaden geraucht haben, können 30-40% aller Tumorleiden dem Rauchen als Ursache zugeschrieben werden (Parkin et al. 1994).

#### 1.2.2.2. Alkohol

Alkohol, insbesondere in der Kombination mit Rauchen induziert insbesondere Tumoren von Mundhöhle, Pharynx, Larynx und Ösophagus. Alkoholkonsum verursacht über den Umweg der Leberzirrhose primäre Lebertumore.

#### 1.2.2.3. Diät

Während ein hoher Anteil an Gemüse und Obst das Risiko von Tumoren des Larynx, der Lunge, des Ösophagus und des Magens vermindert, scheint der Genuß von Fleisch und tierischen Fetten die Inzidenz für Kolonkarzinome zu erhöhen. Regelmäßige körperliche Aktivität vermindert das Kolonkarzinomrisiko. Aflatoxine erhöhen das Risiko für hepatozelluläre Karzinome (Blot et al. 1993).

#### 1.2.2.4. Infektionen

16% aller Tumoren weltweit werden durch Infektionen ausgelöst. Das humane Papilloma Virus (HPV) ist bei 82% der Cervixkarzinome nachweisbar. 60% der Magenkarzinome besitzen Infektionen mit Helicobacter pylori. Das Epstein-Barr Virus ist mit 60% der Hodgkin Erkrankungen assoziiert.

#### 1.2.2.5. Sonnenexposition

Bei über 90% der Patienten mit malignen Melanomen ist nach einer Studie der Harvard Universität Sonnenstrahlung verantwortlich.



#### 1.2.2.6. Andere Ursachen

5% aller Tumoren werden durch andere, hier nicht aufgelistete Faktoren verursacht.

### 1.3. Onkogene und Tumorsuppressorgene

Die meisten malignen Tumoren sind primär monoklonal, da sie in der Regel aus einer Zelle entstehen, die bestimmte Mutationen erlitten hat. Das führt zu einer unkontrollierten Zellproliferation. Gene können entweder aktiviert werden mit einer Zunahme der Funktion oder inaktiviert mit Verlust oder Abnahme der Funktion. Die Gene, die während der Karzinogenese einen Verlust oder eine Abschwächung der Funktion erfahren, werden Tumorsuppressorgene genannt. Beide Genkopien müssen inaktiviert sein, um zu einem kompletten Funktionsverlust zu führen. In der Praxis exprimiert die Zelle dadurch keinen oder einen nicht funktionsfähigen Effektor, das zugehörige Protein. Die Gene, die eine Funktionssteigerung erfahren, werden Proto-Onkogene genannt. Die mutierte Form davon wird als Onkogen bezeichnet. Proto-Onkogene spielen eine essentielle Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und bei der Kodierung von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Signaltransduktoren, zytoplasmatischen Regulatoren, und Transkriptionsfaktoren. Onkogene verhalten sich meist dominant.

#### 1.3.1. Zellmutationen

Mutationen in Säugetierzellen sind ein häufiges Ereignis nach Schädigungen durch Bestrahlung, metabolische Ereignisse, freie Sauerstoffradikale oder durch Umweltgifte. DNA-Reparaturmechanismen sorgen dafür, daß weniger als 1:1000 Basenaustausche in der DNA zu einer Mutation führen.

#### 1.3.2. Onkogene

Bisher wurden zahlreiche Onkogene beschrieben, weitere werden kontinuierlich entdeckt. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Onkogene. Bei vielen Tumoren sind Onkogene nachweisbar. So findet man beispielsweise in 20% aller Tumoren eine Mutation der *ras*-Gene. Beim Pankreaskarzinom ist eine Mutation des K-*ras* Gens in 75-90% vorhanden.

Gen	Normale Funktion	Assoziierter Tumor
H-ras	Signaltransduktion	Melanom, Lunge, Kolon, Pankreas
K-ras	Signaltransduktion	Pankreas, Melanom, Schilddrüse, Leukämieformen
N-ras	Signaltransduktion	Melanom, Genitaltrakt und ableitende Harnwege, Schilddrüse
Erb-B1	Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF)	Astrozytom, Plattenepithelkarzinome
Erb-B2	Wachstumsfaktor-Rezeptor (BGF)	Adeno-Ca des Magens, Mamma und Ovarien
Src	Signaltransduktion (Nicht-Rezeptor Protein Tyrosin Kinase)	Kolon

*Tabelle 1*

Auswahl von häufigen Onkogenen mit Angabe der assoziierten Tumoren.

### 1.3.3. Tumorsuppressorgene

p53 ist das am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen in humanen Tumoren. Über 50% aller Tumoren besitzen eine Mutation des p53 Gens. Bei Lungen- und Kolontumoren ist die Inzidenz weit höher. Bestimmte spezifische Tumormutationen sind mit einer besonderen Karzinogenese verbunden. Zum Beispiel ist das hepatozelluläre Karzinom mit Hepatitis B und Aflatoxin verbunden und zeigt eine hohe Mutationsinzidenz im Codon 249 des p53 Gens. Eine Zusammenstellung häufig anzutreffender Tumorsuppressorgene ist in Tabelle 2 dargestellt.

Gen	Normale Funktion	Assoziierter Tumor
p53	Transkriptionsregulator, fördert DNA-Reparatur, Apoptose und Differenzierung (Aktiviert Bax, GADD45, p21, mdm2, Cyclin G; Hemmt bcl-2, myc, fos, PCNA). Wird durch DNA Schäden und Hypoxie induziert. G1/S Checkpoint Kontrollgen	Mamma, Lunge, Pankreas, Kolon, Gehirn, Sarkome, Li-Fraumeni Syndrom
Rb	Nukleäres Phosphoprotein	Retinoblastom, Osteosarkom, Kleinzelliges Bronchialkarzinom
p16	Zellzyklusregulator, Hemmt die cdk4/Cyclin Progression durch G1	Gliom, Melanom, Mesotheliom, Lunge, Blase, Pankreas

*Tabelle 2*

Auswahl von häufigen Tumorsuppressorgene mit Angabe der assoziierten Tumoren.

## 1.4. Zellzyklusregulatoren

### 1.4.1. Das Tumorsuppressorgen p53

Ein gut untersuchtes Tumorsuppressorgen ist das 53kDa schwere p53-Gen (Lane et al. 1979), welches 11 Exons umfaßt und auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13.1) lokalisiert ist. In der Proteinbiosynthese wird ein 18kb mRNA-Produkt nach der Transkription und als Endprodukt ein Protein mit 393 Aminosäuren gebildet. Das p53-Protein ist ein hauptsächlich nukleäres Phosphoprotein mit einer Halbwertszeit von 6-20 Minuten, das sequenzspezifisch an die DNA bindet. Es ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, indem es die Tumorentstehung durch einen schädigungsabhängigen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase zur DNA-Reparatur verhindern oder, falls dies nicht mehr möglich ist, Apoptose induzieren kann. Damit wird eine Weitergabe des genetischen Defekts an die Tochtergenerationen verhindert. Außerdem kann es bereits aktivierte Onkogene behindern bzw. deren Wirkung abschwächen oder ganz aufheben (Choi et al. 1993). Diese tumorunterdrückende Funktion wird nur gehemmt, wenn beide Allele durch eine Mutation und/oder eine Deletion betroffen sind. In diesem Fall kann entweder kein oder ein nicht-funktionelles konformationsverändertes p53-Protein synthetisiert werden, welches durch eine verlängerte Halbwertszeit von 6-24 Stunden gegenüber dem „Wildtyp-Protein“ mit einer Halbwertszeit von ca. 20 Minuten im Zellkern akkumuliert. Häufig beschrieben wurden diese Mutationen in den p53-Genen bei verschiedenen Tumorzellen. Es wird dabei kein funktionell aktives p53-Protein mehr gebildet, und ein Hemmungsmechanismus in der Entstehung einer neoplastischen Transformation entfällt. Hauptsächlich findet dieses bei Mamma-, Lungen- und Kolonkarzinomen, aber auch beim hepatozellulären Karzinom statt (Choi et al. 1993). Dabei ist die Aminosäuresequenz des p53-Proteins, die an die DNA bindet, am häufigsten von Mutationen betroffen. Es handelt es sich um hoch konservierte DNA-Abschnitte in dem Gen. Besonders häufig sind die Codons 175, 245, 248 und 273 von Mutationen betroffen (Guinn et al. 1997). Nach der Bindung des p53 Proteins an die DNA, stimuliert es ein weiteres Gen, dessen Genprodukt das p21 Protein ist. Dieses interagiert mit einem Protein, welches den Zellzyklus stimuliert (cdk2). Wenn p21 mit cdk2 einen Komplex eingeht, kann die Zelle nicht den nächsten Schritt der Zellteilung vollziehen. Mutiertes p53 kann nicht effektiv an DNA binden, so daß das

p21 Protein das Stop Signal als zellzyklushemmenden Effekt nicht mehr ausführen kann. Somit wird der Zellzyklus unkontrolliert, und Tumoren können sich bilden.

#### 1.4.2. Das Tumorsuppressorgen p21<sup>WAF1</sup>

Das WAF1-Protein spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zellwachstum und der Zellantwort auf eine DNA-Schädigung (Kang et al. 1999). Den Angriffsort für p21<sup>WAF1</sup> bilden die cyclin-abhängigen Kinasen, die den Zellzyklus regulieren. Eine Zellschädigung tritt dann ein, wenn P21<sup>WAF1</sup> mit einer Klasse der cyclin-abhängigen Kinasen Komplexe bildet, so daß die Kinasen in ihrer Aktivität gehemmt werden und es zu einer Inhibition der DNA-Synthese kommt (Boulaire et al. 2000). P21<sup>WAF1</sup> ist ein direkter Effektor von p53. Durch Akkumulation von funktionellem p53-Protein im Zellkern folgt eine Induktion von p21<sup>WAF1</sup>, welches essentiell ist für den p53-vermittelten G<sub>1</sub>-Arrest. Bei Überexpression von p21<sup>WAF1</sup> kommt es zu einem G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>-Arrest. Alleine durch p21<sup>WAF1</sup> kann jedoch keine Apoptose in der Zelle induziert werden (Chen et al. 1996).

#### 1.4.3. Die bcl-2-Familie

Das bcl-2-Gen gehört einer Multigen-Familie an, die in zwei funktionelle Gruppen unterteilt ist: Sie sind eingeteilt in apoptoseinduzierende Gene bzw. deren Genprodukte wie z.B. Bax und in Apoptoseinhibitoren wie bcl-2 (Knudson et al. 1997). Die Lebensdauer der Zelle hängt vom Verhältnis zwischen Apoptoseinhibitoren und -induktoren ab. Die funktionell gegensätzlichen Gene regulieren sich durch Homodimerisation und Hetero-dimerisation. Beispielsweise führen hohe bcl-2-Spiegel bei einem niedrigen Bax-Level zu einer stärkeren bcl-2-Homodimerisation und so zu einer Apoptoseinhibition. Erhöhte Bax-Spiegel gegenüber bcl-2 bewirken eine Heterodimerisation mit bcl-2 und schließlich eine Homodimerisation, die zur Apoptose führt. Außerdem kann das bcl-2-Protein auch mit anderen nicht verwandten Proteinen interagieren und somit seine Effizienz verstärken oder vermindern. Das bcl-2-Gen wurde ursprünglich aus Zellen mit t(14;18)(q32;q21) Translokation in Non-Hodgkin B-Zell-Lymphomen isoliert (McDonnell et al. 1993). Es ist das stärkste bekannte Antiapoptosegen. Sein Genprodukt ist ein 26-kDa schweres membranassoziiertes Protein in Mitochondrien, glattem endoplasmatischem Retikulum und der Kernhülle. Seine Funktion besteht in der Abwehr von Stimuli, die zur Apoptose führen können.

## 1.5. Solide Tumoren mit schlechter Prognose

### 1.5.1. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Während das HCC in den westlichen Ländern selten vorkommt, ist es einer der häufigsten Tumoren in Gegenden mit einer hohen Durchseuchung mit Hepatitis B (Stuver et al. 1997; Hayashi et al. 1993; Feitelson et al. 1998). In Deutschland wurden 1997 bei Männern 4,7 und bei Frauen 2,5 Fälle pro 100.000 Einwohner registriert (WHO 1997). Hingegen stellt es in Südostasien (China, Philippinen, Japan) und im südlichen Afrika die zweithäufigste Todesursache durch Krebs dar (Tang et al. 2000). Bei einer weltweiten Inzidenz von etwa 1 Mio. Fällen pro Jahr zählt es damit zu den häufigsten Tumoren (Lui et al. 2000, Yu et al. 2000).

Als Ursachen des hepatozellulären Karzinoms gilt vor allem die Leberzirrhose. So entstehen 90% der HCC's in zirrhotischen Lebern. Häufig werden HCC's sekundär durch langjährigen Alkoholkonsum, chronische HBV- oder HCV-Infektion, Hämochromatose, meist über die Zwischenstufe der Zirrhose, verursacht. Auch ein  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel und exogene Toxine wie Aflatoxin B1-Exposition aus Zerealien, Thorotrast, Vinylchlorid, Thoriumdioxid oder Anabolika sind kanzerogen für Leber (Stuver et al. 1997). Nicht zuletzt scheint auch verunreinigtes Trinkwasser, (Tang et al. 2000) Nikotinabusus (Bruix et al. 1992) oder Kontrazeptiva (Fiel et al. 1996) die Entstehung eines HCC zu begünstigen.

Wie bei vielen Tumorarten sind auch beim HCC Mutationen im p53-Gen häufig beschrieben, vor allem bei weniger differenzierten größeren Tumoren mit Riesenzellen. Diese Punktmutationen treten oft in den Regionen auf, in denen Hepatitis-B-Viren und Aflatoxin B1 (Interaktion von Aflatoxin B1 und Guanin im Codon 249 des p53-Gens) prävalent sind (Hayashi et al. 1993).

Die therapeutischen Möglichkeiten der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms sind sehr beschränkt und die Prognose ist mit einer mittleren Überlebenszeit von 8 Monaten eher schlecht (Schoniger-Hekele et al. 2001). Nur die Operation kann eine Heilung erzielen. Somit ist sie die Therapie der Wahl, wenn die Bedingungen wie Größe des Tumors, Zirrhosestadium und Alter des Patienten eine Resektion zulassen. Die Resektion wird nur bei Patienten ohne Zirrhose oder mit einer CHILD A Zirrhose durchgeführt, da die höheren Zirrhosestadien CHILD B und C aufgrund des drohenden postoperativen Leberversagens einer anderen Therapie unterzogen werden müssen. Wenn die Voraussetzungen erfüllt sind, ist die Lebertransplantation

die Behandlung mit den besten Überlebensraten. Alle anderen Patienten werden anderen Therapien unterzogen. Hier sind besonders die arterielle Chemoembolisation (TACE), die laserinduzierte Thermoablation (LITT), die perkutane Ethanolinjektion (PEI) und die Radiofrequenzablation (RITA) (Bruix et al. 1992) zu nennen. Eine für das HCC allgemein anerkannte Chemotherapie steht nicht zur Verfügung. Die zytotoxische Behandlung zeigt nur marginale Wirkung. So kann bei der Chemoembolisation mit Zugabe von Lpiodol die 3-Jahresüberlebensrate um 19 – 27% gesteigert werden (Lencioni et al. 1997). Bei einer systemischen Chemotherapie mit Cisplatin, Mitomycin C, Mitoxantrone, Vinblastin u.a. wurden nur sehr geringe Remissionsrate und kurze Remissionsdauer erreicht. Bei geringem Ansprechen der Chemotherapie fallen die Nebenwirkungen der zytotoxischen Medikamente besonders ins Gewicht. Lebensverlängerung durch konventionelle Chemotherapie ist nicht zu erwarten (Bruix et al. 1992). Das Überleben hängt in diesen Fällen mehr vom Ausmaß der zugrundeliegenden Leberzirrhose ab. Die Entwicklung neuer wirksamer Therapieformen ist aufgrund dieser Ergebnisse dringend notwendig. Neue Therapien sollten nicht lebertoxisch sein, da Patienten mit Leberzirrhose ein deutlich reduziertes funktionelles Leberparenchym haben. Weil das HCC ein gut vaskularisierter Tumor ist, wäre eine antiangiogenetische Wirkung wünschenswert und erfolgsversprechend. Schließlich sollte eine neue Therapie auch eine direkte tumorhemmende Wirkung auf die HCC-Zellen besitzen.

#### 1.5.2. Das Pankreaskarzinom

Die Ursache dieser Erkrankung ist weitgehend unbekannt. Dem Rauchen werden bis zu 30% Mitursache angelastet. Eine Diät reich an gesättigten Fettsäuren kann begünstigend wirken, nicht so Koffein und Alkohol. Die sporadische chronische Pankreatitis birgt ein 5%iges Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Die hereditäre Disposition erhöht das Risiko um das 40 – 70-fache. In Mitteleuropa ist das Pankreaskarzinom die vierthäufigste Todesursache durch maligne Tumoren.

90% der Tumoren sind duktale Adenokarzinome. 75% entstehen im Pankreaskopf, 15% im Korpus und 10% im Schwanz. Genetische Veränderungen sind häufig. Dazu zählt das K-ras Onkogen, welches in 90 – 100% der Tumoren exprimiert wird. Häufig mutierte Tumorsuppressorgene sind p53 (60%), p16 (80%) und SMAD4 (50%).

Therapeutisch kann nur in ca. 20% der Fälle unter kurativem Ansatz vorgegangen werden, da die meisten Patienten in einem sehr fortgeschrittenen Stadium zum Arzt

kommen. Nur eine komplette operative Entfernung des Tumors kann eine Heilung bewirken. Bei Pankreaskopftumoren wird in der Regel die Kausch-Whipple Operation mit oder ohne Erhalt des Pylorus durchgeführt. Inoperabilität oder eine Situation ohne Heilungschance besteht bei Fernmetastasierung sowie Infiltration in Nachbarorgane wie Mesenterialwurzel. In solchen Fällen kann eine palliative Operation durchgeführt werden. Eine biliodigestive Anastomose dient der Beseitigung des Ikterus, eine Gastroenterostomie stellt die Magen-Darm-Passage wieder her. Konservative Therapieoptionen bestehen demnach nur adjuvant, neoadjuvant oder palliativ. Es konnte gezeigt werden, daß das Nucleosid-Analogon Gemcitabine die mediane Überlebensrate im Vergleich zu einem Regime mit 5-Fluorouracil (5-FU) marginal von 4,6 auf 5,7 Monate verbessert. Die adjuvante Therapie mit 5-FU, Doxorubicin und Mitomycin C konnte das mediane Überleben von 11 auf 23 Monate verdoppeln, jedoch führte es nicht zu einer Verbesserung der Langzeitüberlebensrate. Eine Radiochemotherapie mit 5-FU führte zu einer marginalen Verlängerung der medianen Überlebensrate (McGinn et al. 2002). Eine intraoperative Bestrahlung brachte keinen Vorteil. Eine ESPAC (European Study Group for Pancreatic Cancer) Studie konnte einen Benefit einer adjuvanten Chemotherapie aufzeigen, jedoch brachte die Radiochemotherapie keinen Vorteil (Neoptolemos et al. 2001). Die derzeit beste Therapie besteht aus Kombinationen zwischen Gemcitabine und anderen zytostatisch wirkenden Substanzen (Jacobs 2002).

Die beschriebenen Verbesserungen im medianen Überleben lassen zwar auf weitere Fortschritte hoffen, jedoch bleibt die Prognose dieser Erkrankung denkbar schlecht. Der Bedarf an neuen Substanzen, die eine Verlängerung des medianen Überlebens möglichst um Jahre bewirken, ist wie beim HCC nach wie vor sehr groß. Im Idealfall sollte diese Substanz oder die Kombination aus mehreren neuen Substanzen die adjuvante Chemotherapie verbessern, oder neoadjuvant eingesetzt werden, um primär inoperable Tumoren resektabel zu machen.

### 1.5.3. Das Bronchialkarzinom

Bronchialkarzinome gehören zu den häufigsten Tumoren weltweit und gehören zu den Tumoren, die eine steigende Inzidenz haben. Das Bronchialkarzinom ist die häufigste Todesursache durch Tumoren bei Männern und hat in den USA das Mammakarzinom bei Frauen im zweiten Teil der 80er Jahre überholt. In

Industrieländern sind die Tumorinzidenzen bis auf das Bronchialkarzinom in den letzten 20 Jahren rückläufig. In derselben Zeitspanne ist die Todesrate in den USA und Canada um das dreifache angestiegen, allerdings zeigt sich ein leichter Rückgang in den letzten Jahren. In Entwicklungsländern wird weiter ein Anstieg der Inzidenz beobachtet. Diese Veränderungen gehen mit Rauchgewohnheiten und Gehalt an Schadstoffen in Zigaretten einher (Ries et al. 1991). Die Prognose des Bronchialkarzinoms ist sehr schlecht mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 13%. Diese Überlebensrate ist in den letzten 20 Jahren konstant geblieben, und es erscheint unwahrscheinlich, daß sich diese Zahlen in der nächsten Zukunft deutlich verbessern werden. Mit dem seit kurzem beobachteten leichten Rückgang der Inzidenzen in den entwickelten Ländern besteht Hoffnung, daß sich dieser Trend fortsetzt und so zu einer verringerten Todeszahl an dieser Erkrankung führt.

Die primäre derzeit etablierte Therapie besteht aus den drei Säulen Operation, Bestrahlung und Chemotherapie, die einzeln, jedoch meist in Kombination angewandt werden. Welche Kombinationen in welchen Dosen eingesetzt werden, hängt von der Tumorart, vom Stadium und der individuellen Situation ab. Die Operation ist abgesehen von kleinzelligen Karzinomen die Therapie der Wahl bei Tumoren, die auf den Hemithorax beschränkt, oder im Stadium I und II sind, bei denen die Ausdehnung nicht über die bronchopulmonalen Lymphknoten hinausgeht. Bei fortgeschritteneren Tumoren kommen Chemotherapie und Bestrahlung hinzu. Das Bronchialkarzinom gehört zu den chemosensiblen Tumoren. Die am häufigsten verwendeten Substanzen zur Chemotherapie waren bis 1990 Cisplatin, Mitomycin-C, Ifosfamid, Vindesin, Vinblastin und Etoposid. Neuere wirksame Substanzen seit 1990 sind Vinorelbin, Paclitaxel, Docetaxel, Gemcitabine, Edatrexat und Irinotecan (Ginsberg et al. 1997).

Auch beim Bronchialkarzinom besteht trotz vieler neuer Substanzen ein erheblicher Bedarf an Verbesserungen der zur Verfügung stehenden Therapieoptionen oder an neuen Therapiekonzepten und Substanzen mit neuen Wirkungsspektren.



## 1.6. Neue Therapieansätze

### 1.6.1. Hepatozelluläres Karzinom

Therapeutische Maßnahmen auf molekularbiologischer Basis sind bislang sehr enttäuschend gewesen, so daß derzeit keine wirklich effektive Chemotherapie oder molekulare Therapie zur Verfügung steht. Kombinationen aus interventionellen radiologischen Verfahren und Chemotherapie scheinen einen geringen Vorteil zu haben, jedoch auch nur in der adjuvanten und neoadjuvanten, nicht jedoch in der palliativen Situation. 13 klinische Studien sind zu diesem enttäuschenden Ergebnis gekommen (Schwartz et al. 2002).

### 1.6.2. Pankreaskarzinom

Hier gibt es außer der konventionellen Chemotherapie viele Ansätze zu Therapie auf molekularbiologischer Basis, die in einem Übersichtsartikel zusammengefasst sind (Rosenberg 2000). So werden Somatostatinanaloga und Antiandrogene als adjuvante Therapiemaßnahme eingesetzt. Die Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasen durch Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen und der Angiogenese wird experimentell untersucht. Kleine Moleküle wie Retinoide, die mit dem Zellzyklus interferieren, hemmen die Zellproliferation. Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern ist bei soliden Tumoren indiziert, die eine Überexpression bestimmter Rezeptoren von Wachstumsfaktoren wie dem EGF Rezeptor aufweisen (Mendelsohn 2001). Eine Unterbrechung der Signaltransduktion mit Farnesyltransferase ist ebenfalls ein neues Wirkprinzip. Schließlich kommt Gentherapie mit unterschiedlichen Ansätzen zum Einsatz. Ein p53 exprimierendes Adenovirus (Heise et al. 1997) oder spezifisch hergestellte Vakzine (Gilliam et al. 2002) konnten eine Tumorchemmung bewirken.

### 1.6.3. Bronchialkarzinom

Fortschritte im Verständnis der Tumorbilogie von Bronchialkarzinomen führen zu neuen Therapieansätzen. Das häufige Auftreten von K-ras Punktmutationen wurde mit einer verkürzten Überlebenszeit bei komplett resezierten nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) in Zusammenhang gebracht (Slebos et al. 1990). Klinische Studien bei Patienten mit K-ras Mutationen sind in Planung bzw. laufen. Veränderte Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und einer

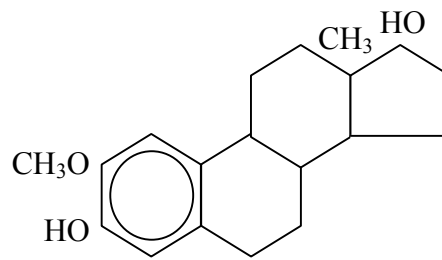
seiner Liganden, TGF- $\alpha$  sind ebenfalls häufige Ereignisse (Rusch et al. 1993), die zu klinischen Studien mit monoklonalen Antikörpern führten, die spezifisch an den EGFR binden und somit das Wachstums der Tumorzellen unterbinden (Divgi et al. 1991; Dillman et al. 1989). Nicht zuletzt trifft man eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 als häufigste genetische Abnormalität an (Chiba et al. 1990; Carbone et al. 1994). Die mutierten Sequenzen des p53 Proteins bilden ein einzigartiges, tumorspezifisches Antigen, gegen das immuntherapeutische Ansätze gerichtet werden können. Die Wiederherstellung des Wild-Typ p53 Gens in der Tumorzelle wird durch Adenoviren geleistet, die das p53 Gen in die Zelle einschleusen, um so ein funktionelles p53 Protein abzuschreiben, was schließlich zum Tod der Tumorzelle führt. Adenovirale Vektoren werden am häufigsten für den Gentransfer von Tumorsuppressorgenen verwendet, da sie effizient viele verschiedene Zellsysteme infizieren können. p53 stellte sich als geeignetes Gen mit klinischer Wirksamkeit heraus, da es ein zentrales Gen in der Zellzyklusregulation ist, und da etwa 50% aller Karzinome eine p53 Mutation aufweisen. Ein tumorhemmender Effekt wurde vielfach bei p53 mutierten Tumoren in vitro und in vivo gezeigt (Bookstein et al 1996; Hamada et al 1996; Nielsen et al 1998; Spitz et al 1996). Auch in der klinischen Behandlung maligner Tumoren findet p53 zunehmenden Einsatz. So wurden Bronchialkarzinome mit p53-Retroviren (Roth et al 1996) oder Ovarialkarzinome (Runnebaum et al 1998) und Bronchialkarzinome (Roth et al 1998) mit p53 Adenoviren behandelt. Die adenoviralen Vektoren scheinen für die Zwecke des Gentransfers die effizientesten zu sein (Cristiano et al 1998). Phase II Studien mit p53 exprimierenden Adenoviren sind bereits abgeschlossen, Phase III Studien in der Planung und Durchführung (Swisher et al. 2002).

Trotz vielversprechender Ansätze blieben die Ergebnisse bislang enttäuschend, so daß weiterhin ein erheblicher Bedarf an neuen Therapieansätzen und der Entwicklung neuer wirksamer Substanzen besteht.

### **1.7. 2-Methoxyestradiol (2-ME)**

Ein sehr vielversprechendes Agens scheint der physiologische Östrogenmetabolit 2-Methoxyestradiol zu sein. Im Östrogen-Metabolismus entstehen verschiedene Abbauprodukte durch eine Oxidation am A- oder D-Ring des Steroidgerüsts, die jedoch funktionell keine inaktiven Substanzen sind. So zeigen die Produkte beider

Abbauförmen teilweise gegensätzliche Wirkungen: D-Ring Metaboliten zeigen proliferationsstimulierende, A-Ring Metaboliten, die Catecholöstrogene wie auch 2-Methoxyestradiol, proliferationsinhibierende Eigenschaften gegenüber Tumorzellen (Lippert et al. 1999). 2-ME (3,17β-Dihydroxy-2-methoxy-1,3,5[10]-estratriene) ist ein solcher endogener Östrogenmetabolit mit einer Oxidation am A-Ring, der physiologischerweise in geringen Mengen mit dem Urin ausgeschieden wird. Abbildung 1 zeigt die typische Steroidstruktur.



### **Abbildung 1**

Strukturformel von 2-Methoxyestradiol

2-Methoxyestradiol ist ein physiologischer Metabolit der endogenen Östrogene Östradiol-17β und 17-Ethynylestradiol (Seegers et al 1989). Östradiol wird durch das NADPH-abhängige Cytochrom P450 System vor allem in der Leber zu Catecholöstrogenen (2- oder 4-Hydroxyestradiol und 2- oder 4-Hydroxyestron) (Martucci et al 1993) hydroxyliert. Diese Catecholöstrogene werden metabolisch O-methyliert zu Monomethylethern wie 2-Methoxyestron durch Catechol-O-Methyltransferase (COMT), ein Enzym, welches in vielen Organen wie Leber, Niere, Gehirn, Placenta, Uterus, Brustdrüse und Erythrozyten vorkommt (Amin et al. 1983). 2-Methoxyestron besitzt nur ca. 1% der wachstumshemmenden Eigenschaften von 2-Methoxyestradiol bei Endothelzellen von Blutgefäßen oder Fibroblasten (Fotsis et al. 1994). Es wird vermutet, daß die 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase wechselseitige Konversionen zwischen 2-Methoxyestronen und 2-Methoxyestradiol katalysiert (Zhu et al. 1998), da es Östrone und Östradiol wechselseitig konvertiert (Poutanen et al. 1995). Unter diesem Aspekt könnte 2-Methoxyestrone ein direkter Vorläufer von 2-Methoxyestradiol sein. Im Blut ist 2-ME in konjugierter und unkonjugierter Form vorhanden. Die Serumkonzentrationen von 2-Methoxyestrogenen variieren von 10.3pg/ml bei Männern bis auf 3768pg/ml bei schwangeren Frauen (Berg et al. 1983; D'Amato et al. 1994). 2-ME hat eine höhere

Bindungsaffinität für das geschlechtshormonbindende Globulin im Blut als Östradiol (Dunn et al. 1983). Die Affinität von 2-ME zum Östrogenrezeptor ist minimal (Merriam et al. 1980, LaVallee et al. 2000). Es wird physiologischerweise mit dem Urin ausgeschieden (Gelbke et al. 1976).

Von besonderem Interesse ist 2-ME, da es die Fähigkeit hat, hemmend auf die Tumorzellproliferation und auf ein weiteres Kompartiment des Tumors, die Angiogenese, zu wirken. Somit hat 2-ME im Gegensatz zu den meisten anderen Substanzen einen doppelten Angriffspunkt. Erstmals wurde ein antiangiogenetischer Effekt und Proliferationshemmung durch 2-ME 1994 berichtet (Fotsis et al. 1994). Weitere Untersuchungen an Mammakarzinomzellen zeigten eine gleichfalls effektive Wachstumshemmung (Klauber et al. 1997; Seegers et al. 1989, Lottering et al. 1992, Cushman et al. 1995, Zhu et al. 1998, Zoubine et al. 1999, Amorino et al. 2000). Bei Lungenkrebszellen konnte gezeigt werden, daß 2-ME in der Lage ist, funktionell aktives p53 Protein zu stabilisieren, was zu einer verlängerten Halbwertszeit und somit erhöhter Effektivität in der Induktion der Apoptose führte (Mukhopadhyay et al. 1997; Mukhopadhyay et al. 1998). Auch andere Tumoren wie Neuroblastome (Wassberg et al. 1999, Nakagawa-Yagi et al. 1996), Angiosarkome (Arbiser et al. 1999, Reiser et al. 1998) und Magenkarzinome (Lui et al. 2000) können erfolgreich durch 2-ME an der Proliferation gehemmt werden. Die Mechanismen, die zu einer Wachstumshemmung verschiedener Tumorzellen führen sind jedoch noch zum Teil unbekannt.

Verschiedene Mechanismen sind bereits beschrieben worden. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der Wirkmechanismen für die Wachstumshemmung von Tumorzellen.

Die Wirkmechanismen lassen sich in drei Gruppen einteilen. Einerseits handelt es sich bei 2-ME offenbar um einen Angiogeneseinhibitor, der über die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF oder über eine Induktion der Apoptose bei Endothelzellen wirkt. Zum anderen greift 2-ME in die Zellteilung ein, indem es an der Colchicinbindungsstelle die Tubulinpolymerisation hemmt, oder die Mitose durch tubulinunabhängige Mechanismen hemmen kann. Eine dritte wichtige Gruppe von Wirkmechanismen ist die Induktion von Apoptose. Diese kann p53 abhängig oder p53 unabhängig sein. Das wichtige Antiapoptosegen bcl-2 kann phosphoryliert oder herunterreguliert werden, was zur Inaktivierung führt. Zellzyklusregulatoren wie p34cdc2 und Cyclin B1 können ebenfalls herunterreguliert werden. Nicht zuletzt kann das intrazelluläre NOS (Nitric Oxygen Synthase) und NO erhöht werden. Diese

molekularen Veränderungen führen jeweils zu einer Induktion des apoptotischen Zelltodes.

Mit diesen Mechanismen hat man eine tumorhemmende Wirkung auf zwei Tumorkompartimente, auf der einen Seite eine direkte Hemmung der Proliferation durch Apoptoseinduktion oder Mitosehemmung, auf der anderen Seite eine antiangiogenetische Wirkung, die für die klinische Anwendung bedeutsam ist.

#### **Antiangiogenese**

- Hemmung der Neovaskularisierung
- Induktion von Apoptose bei Endothelzellen
- Hemmung der bFGF und VEGF induzierten Neovaskularisierung
- Herunterregulierung von VEGF

#### **Hemmung der Mikrotubuli**

- Bindung an der Colchicinbindungsstelle
- Hemmung der Tubulinpolymerisation
- Mitosearrest ohne Tubulinpolymerisation

#### **Induktion von Apoptose**

- p53 Stabilisierung
- p53 unabhängige Apoptose
- bcl-2 Phosphorylierung
- bcl-2 Herunterregulierung
- Herunterregulierung von p34cdc2 und Cyclin B1
- Erhöhung von intrazellulärem NOS (Nitric Oxygen Synthase) und NO

#### ***Tabelle 3***

Bislang untersuchte Wirkmechanismen von 2-ME auf Tumorzellen. Drei wesentliche Gruppen sind von Bedeutung.

## 2. Zielsetzung

Viele Tumoren besitzen trotz Ausschöpfung aller modernen diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen nach wie vor eine schlechte Prognose. Bei den soliden Tumoren sind dies u.a. das hepatozelluläre Karzinom, das Pankreaskarzinom und das Bronchialkarzinom. Da wir diese drei Tumorarten in der Klinik unserer Abteilung regelmäßig bei Patienten sehen, die sich damit zur Operation vorstellen, und da die Prognose schlecht ist, erschienen uns gerade diese Tumoren besonders interessant, um neue Therapieansätze zu untersuchen. Durch Vorarbeiten motiviert, sollte die neue Substanz 2-ME der klinischen Anwendung näher gebracht werden. Dabei ging es um mehrere Fragestellungen. Der wichtigste Punkt hierbei sollte sein, durch 2-ME eine Wachstumshemmung von Tumoren herbeizuführen. Es sollten verschiedene Tumoren auch unter dem Gesichtspunkt der Generalisierbarkeit der gefundenen Ergebnisse untersucht werden. Beim Pankreas- und hepatozellulären Karzinom sollten aus demselben Grund mehrere Zelllinien verwendet werden. Bei den Untersuchungen zum Bronchialkarzinom zeigten Vorarbeiten bereits eine tumorhemmende Wirkung durch 2-ME, so daß eine andere Fragestellung primär verfolgt wurde. Hier sollte, basierend auf den Vorergebnissen, untersucht werden, ob durch eine Kombination mit Gentherapie der tumorhemmende Effekt jeder der einzelnen Komponenten verstärkt werden kann, oder sogar ein Synergismus beobachtet werden kann. Da die untersuchte Art von Gentherapie unter Verwendung von Wild-Typ p53 exprimierenden Adenoviren bereits Einzug in die Klinik erhalten hat, sollte hiermit ein klinisch relevanter Kombinationspartner für 2-ME gefunden werden. Auch beim Pankreaskarzinom und beim hepatozellulären Karzinom sollten Kombinationen mit anderen Substanzen, auch hier klinisch eingesetzte Zytostatika, untersucht werden, um klinische Fragestellungen auf diese Weise frühzeitig beantworten zu können. Als präklinische Versuche sollten Tierversuche an Mäusen dienen, die nicht nur den in vivo Effekt der Wachstumshemmung von 2-ME auf Tumoren verdeutlichen, sondern auch helfen sollten, weitere Wirkmechanismen von 2-ME wie z.B. den Effekt auf die Angiogenese, aufzudecken. Verschiedene Tumormodelle kamen in Betracht. Lungenmetastasenmodelle eignen sich gut, da die Tumorlast der einzelnen Tiere gut verglichen werden kann. Diese Modelle waren zum Teil etabliert und sollten für das Bronchialkarzinom und das Pankreaskarzinom

eingesetzt werden. Subcutane Tumoren haben den Vorteil der intraindividuellen Verlaufskontrolle des Tumorwachstums. Nach Vorversuchen konnte eine HCC Zelllinie (Hep 3B) identifiziert werden, die subcutan konstant anwächst, so daß wir dieses Modell beim HCC anwenden wollten. Bei den Tierversuchen soll auch die Toxizität durch 2-ME abgeschätzt werden. Es sollte auf Gewichtsverhalten, Nahrungsaufnahme, Bewegungsmuster und möglichen Durchfall geachtet werden. Um eine direkte Toxizität auf normale Hepatozyten einschätzen zu können, sollten Kulturen von normalen humanen Hepatozyten als Kontrollen dienen. Da sich diese Zellen nicht teilen, sollte anhand eines Leberresektionsmodells untersucht werden, ob 2-ME Apoptose an gesunden proliferierenden Hepatozyten induziert. Weiterhin sollten einige der bereits beschriebenen und neue Wirkmechanismen untersucht werden. Wichtig ist hierfür das p53 Protein, welches eine zentrale Funktion in der Zellzyklusregulation besitzt. Versuche mit Zelllinien, die unterschiedliche Mutationsstadien für das p53 Gen besitzen, sollten einen eventuell bestehenden Zusammenhang zwischen 2-ME und p53 aufdecken. Dieser Effekt könnte auch indirekt über die Veränderung anderer zellzyklusregulatorischer Proteine durch 2-ME bestehen. Eine entscheidende Rolle bei den Untersuchungen zu den Mechanismen spielt die Induktion der Apoptose. Stark tumorhemmende Substanzen wirken über diesen Mechanismus, der mit verschiedenen Techniken nachgewiesen werden kann. Weitere Untersuchungen an multiresistenten Zellen sollten aufzeigen, ob 2-ME in der Lage ist, diese Resistenz zu überwinden. Auch hierzu sollten Zellen von zwei Organsystemen, dem Bronchialkarzinom und dem Pankreaskarzinom, benutzt werden. Die Bedeutung für die klinische Situation ist groß, da viele Tumoren, insbesondere bei Rezidiven resistent sind gegen die gängigen Zytostatika. Nach diesen Untersuchungen sollen klinische Studien geplant und durchgeführt werden, wie sie zum Teil in den USA bereits aktuell sind. Unsere Zieltumoren sind dafür primär das hepatozelluläre - und das Pankreaskarzinom. Nach diesen durchgeführten präklinischen Untersuchungen sollte der Weg für eine klinische Anwendung weitgehend geebnet sein.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Zelllinien

##### 3.1.1. Pankreaskarzinomzellen

Die verwendeten Zellen waren humane Pankreaskarzinomzellen, die alle eine Mutation für das p53 Gen aufwiesen. Da das p53 Gen eine zentrale Bedeutung in der Zellzyklusregulation besitzt, war der Mutationsstatus von großer Wichtigkeit. Alle Zelllinien besaßen eine Mutation für das p53 Gen. Verwendet wurden MIAPaCa-2, bezogen von ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), PaTu8902, PaTu 8988t und PaTu 8988s. Die letzten drei Zelllinien wurden von Dr. P. Elsässer aus dem pathologischen Institut der Universität Marburg zur Verfügung gestellt. Die PaTu 8988t und PaTu 8988s stammen aus demselben Tumor. Die Klone der multiresistenten Zellen EPP85-181P (sensibel), EPP85-181RNOV (mdr-1 Gen negativ) und EPP85-181RDB (mdr-1 Gen positiv) wurden vom Institut für Pathologie der Charité zur Verfügung gestellt. Die letzten drei Zelllinien sind Klone, die aus einer Zelllinie durch Gentransfer von Resistenzgenen konstruiert wurden. Alle Zellen weisen eine Mutation für das p53 Gen auf. Das verwendete Wachstumsmedium war DMEM (Dulbecco's modified essential medium) mit Zusatz von 5% hitzeinaktiviertem FBS (Fötales Kälberserum), 5% hitzeinaktiviertes Pferdeserum, 1% Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL und 1% L-Glutamin (200 MM, GibcoBRL).

##### 3.1.2. Zellen hepatozellulärer Karzinome

Vier humane Tumorzelllinien Hep G2, SK-Hep 1, Hep 3B und PLC/PRF/5 wurden verwendet. Bei der Wahl der Zelllinien war der p53 Mutationsstatus von Bedeutung, da p53 ein zentrales Molekül für die Zellzyklusregulation ist und durch 2-ME heraufreguliert werden kann, so daß die erwartete Wachstumshemmung von 2-ME auf diese Zellen möglicherweise p53 abhängig ist. Die ersten beiden Zelllinien exprimieren Wild-Typ p53, die beiden letztgenannten sind mutiert für das p53 Gen. Da die Hep 3B Zellen eine Deletion des p53 Gens besitzen, wird kein p53 Protein gebildet. Alle vier Zelllinien wurden von ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) bezogen. Das verwendete Medium war MEM ("Minimum Essential Amino Acid Medium" with Earle's Salts, GibcoBRL) mit einem Zusatz von



10% hitzeinaktiviertem FBS (Fötalem Kälberserum), 1% Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL, 1% L-Glutamin (200 MM, GibcoBRL), 1% Sodumpyruvat (100 MM, GibcoBRL) und von 1% nicht essentiellen Aminosäuren, GibcoBRL)

### 3.1.3. Bronchialkarzinomzellen

Verwendung fanden die H1299 Zellen, die von einem humanen nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom stammen, die eine Mutation mit Deletion für das p53 Gen aufwiesen. Bezogen wurden die Zellen von Dr. Gazdar aus der Abteilung für Thoraxchirurgie der University of Texas, Dallas, Texas, USA. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI Medium, ergänzt mit 5% hitzeinaktiviertem FBS, 1% Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL, 1% L-Glutamin (200 MM, GibcoBRL), 1% Sodumpyruvat (100 MM, GibcoBRL) und mit 1% nicht essentiellen Aminosäuren, GibcoBRL). Die Cisplatin-resistenten H1299 Zellen wurden für 10 Monate einer steigenden Dosis Cisplatin ausgesetzt, bis ein Überleben und Proliferation in 2.0mg/ml möglich war. Das verwendete Medium entsprach dem der parentalen H1299 Zellen, jedoch betrug die Konzentration des FBS 10%.

A549 Zellen eines humanen nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms exprimierten den Wild-Typ des p53 Gens. Sie wurden von ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD USA) bezogen. Das verwendete Medium war F12 Medium mit Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem FBS und 1% Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL.

### 3.1.4. Normale humane Hepatozyten

Die Hepatozytenkulturen wurden durch Perfusion eines Leberresektates, meist bei Metastasenresektion, unter sterilen Bedingungen mit einer enzymatischen Lösung mit DNase und Kollagenase (Strom et al. 1993) gewonnen. Man konnte sie ca. 10 Tage in Kultur halten. Das verwendete Medium war Williams Medium E mit Zusatz von 10% FBS, 1% L-Glutamin (200 MM, GibcoBRL), 1% Sodumpyruvat (100 MM, GibcoBRL) und von 1% nicht essentiellen Aminosäuren, GibcoBRL). Die Hepatozyten dienten als Kontrollzellen bei einem Großteil der Experimente.

## 3.2. Kultur und Proliferationsanalysen

### 3.2.1. Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden als subkonfluente adhärenente Monolayerkulturen in einem Heraeus-Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, und 95% O<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Falcon) gehalten. Einmal wöchentlich wurden die Zellen passagiert: Die enzymatische Ablösung der Zellen vom Flaschengrund erfolgte durch kurze Inkubation im Brutschrank mit 0,25% Trypsin (GibcoBRL). Zum Passagieren oder Aussetzen der Zellen in einem Experiment wurden sie mittels einer Zählkammer nach Neubauer unter einem Durchlichtmikroskop von Olympus gezählt und in der gewünschten Anzahl kultiviert. Nach Zellzählung wurden die Zellen in einer 24-well-Platte (Falcon) mit  $2 \times 10^4$  Zellen und 1 ml Medium pro well ausgesetzt. Gleich nach Aussaat der Zellen in die Kulturschalen wurden bei je zwei Schalen der Kontrollgruppe und der Testgruppen Zellzahlbestimmungen zur Überprüfung der Korrektheit der angenommenen Zelldichte durchgeführt. Die Platte wurde 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der nach 48 Stunden angewachsenen Zellen erfolgte durch Auszählen mittels eines Phasenkontrastmikroskops von Zeiss (Axiovert 135) von jeweils vier Einheiten aus der Kontrollgruppe bzw. aus den Therapiegruppen. Daraus läßt sich die Anzahl der nach der Aussaat tatsächlich angewachsenen Zellen, d.h. die "plating efficiency" bestimmen. Danach wurden die 12 wells in vier Behandlungsgruppen eingeteilt, so daß jeweils drei wells einer Gruppe zugeordnet waren. Die erste Gruppe diente zur Kontrolle und wurde nur mit Medium behandelt, zur Behandlung der zweiten Gruppe wurde ein unwirksamer Östrogenmetabolit als Kontrollöstrogen MEC (16ß-Hydroxy-17ß-estradiol) mit einer Konzentration von 2µM benutzt, die Zellen der dritten bzw. vierten Behandlungsgruppe wurden mit dem Östrogenmetaboliten 2-ME (2-Methoxyestradiol) in verschiedenen Konzentrationen von 0,5µM bzw. 5,0µM versetzt. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation im Brutschrank. Die Auszählung fand regelmäßig in 48-stündigen Abständen an den Tagen 1, 3 und 5 statt. Die Zellzählung erfolgte mittels Zählkammer nach Neubauer. Die Zählungen wurden jeweils zweimal durch zwei unabhängige Personen blind durchgeführt und aus den beiden Werten der Mittelwert gebildet. Insgesamt wurde diese Zellzahlbestimmung für jede Zelllinie dreimal wiederholt und von den drei Werten der Mittelwert berechnet.

### 3.2.2. Humane Hepatozyten

Zur Einschätzung der Toxizität von 2-Methoxyestradiol auf humanes Lebergewebe wurden frische humane Hepatozyten verwendet. Eine 6-well Platte (Falcon) wurde mit einem Collagen-Precoat überzogen. Dazu wurden 3ml einer Lösung von 2%igem Collagen (aus Rattenschwänzen, Sigma) in PBS in jedes Well gegeben, diese bei Raumtemperatur 30 min. inkubiert und dann die Flüssigkeit entfernt. Die Anzahl der Hepatozyten wurde ausgezählt und pro well  $1 \times 10^6$  Zellen hineingegeben. Nach 48stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen behandelt. Dabei wurden die Wells zufällig bestimmten Behandlungsgruppen zugeordnet. Die Behandlungsgruppen bestanden aus einer nur mit Medium behandelten Kontrollgruppe, einer mit MEC 5µM, einer mit 2-Me 2,5µM, einer mit 2-Me 5µM und einer mit 2-Me 10µM behandelten Gruppe. Nach Behandlung wurden die Zellen wiederum 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die morphologische Beurteilung auf möglicherweise toxisch bedingte Zellveränderungen erfolgte blind durch drei unabhängige Untersucher unter einem Phasenkontrastmikroskop. Eine Zellzählung wurde nicht durchgeführt, da diese Zellen in vitro keine Proliferationstendenz haben.

Zur weiteren Untersuchung einer möglichen Zellschädigung wurde zentrifugierter zellfreier Überstand gewonnen und zunächst bei einer Temperatur von -20°C eingefroren.

### **3.3. Therapeutische Substanzen**

Das Wild-Typ p53 exprimierende Adenovirus sowie das als Kontrolle verwendete Lac-Z exprimierende Adenovirus, welches die Beta-Galactosidase codiert, wurden in der Abteilung für Thoracic and Cardiovascular Surgery unter der Leitung von Dr. Jack A. Roth im MD Anderson Cancer Center in Houston, Texas, USA konstruiert. Die Behandlung der Zellen und der Tiere erfolgte in einem S-2 Laborbereich nach den ortsüblichen Richtlinien.

2-Methoxyestradiol wurde von der Firma Steraloids, Newport, RI, USA bezogen. Das Kontrollöstrogen 16-Epiestriol stammt von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland. Alle verwendeten Zytostatika wurden von der Apotheke der Charité bezogen.

### 3.4. Western Blot Analysen:

#### 3.4.1. Aussaat der Zellen, Behandlung und Herstellung des Zelllysats

Zur Bestimmung der Proteinmenge apoptosebezogener Proteine wurden folgende Untersuchungen durchgeführt. Nach Zellzählung wurden die Zellen aller Zelllinien in 10 cm Petrischalen (Falcon) in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Medium pro Schale ausgesetzt. Die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu den Proliferationsanalysen zwei Tage nach Aufsetzen der Zellen. Unterschiedlich war nur, daß hier zwei verschiedene Dosen 2-ME benutzt wurden, die in den Proliferationsanalysen eine ca. 50%ige Wachstumshemmung bewirkten. Die Hep 3B, Hep G2 und PLC/PRF/5 Zellen wurden mit PBS, 5µM MEC, 2,5µM 2-ME oder 5,0µM 2-ME inkubiert. Die SK-Hep 1 Zellen hingegen wurden mit PBS, 3µM MEC, 1,5µM 2-ME oder 3,0µM 2-ME inkubiert. Als Negativkontrolle für p53 diente die Zelllinie Hep 3B, die eine Deletion des p53 Gens aufweist und somit kein p53 Protein bilden kann. Als Positivkontrolle dienten die PLC/PRF/5 Zellen, die ein mutiertes p53 exprimieren, welches unkontrolliert viel nicht funktionelles p53 Protein bildet.

Die Schalen wurden nach der Behandlung für weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zum Ernten der Zellen wurden die Schalen nach Absaugen des Mediums mit 300µl denaturierendem Laemmli – Puffer (25 ml 0,5M Tris pH 6.8 (Sigma), 10 ml 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Pharmacia), 10 ml Glycerol (Merck), 50µl 10% Bromophenol Blue (Aldrich)) versetzt und 10 Minuten auf Eis zur Zelllyse stehengelassen. Nach eingetretener Zelllyse wurde das Lysat mit einem Disposable Cell Scraper (CostarCorporation) vom Grund der Platte abgelöst und in Eppendorf-Hütchen (1,5ml) pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 3.4.2. Messung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurden eine Proteinstandardlösung (aus bovine Albumin, Sigma) mit einer Konzentration von 2 mg/ml, BCA Protein Assay Reagent A (Pierce) und B (Pierce) verwendet. Die Proteinstandardlösung wurde 1:1 mit Aqua B. Braun (Ecotainer®, Braun) verdünnt, um eine Anfangskonzentration von 1 mg/ml zu erhalten. Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden die Proben 2:1 mit Aqua dest verdünnt, um folgende Proteinkonzentrationen zu erhalten: 1 und 2: Leerwert (nur Aqua. dest.), 3 und 4: Prot.-Konz.: 62,5 µg/ml, 5 und 6: Prot.-Konz.: 125 µg/ml, 7 und 8: Prot.-Konz.: 250

µg/ml, 9 und 10: Prot.-Konz.: 500 µg/ml, 11 und 12: Prot.-Konz.: 1000 µg/ml. Diese Verdünnungsreihe wurde zunächst in Mikroröhrchen angesetzt und dann jeweils 20µl davon in die entsprechenden 12 wells der ersten Reihe einer Microtiterplatte (GreinerLabortechnik) pipettiert. Die zu messenden Proben wurden auf Eis aufgetaut und 2 min. bei 1500 U/min. und 4°C zentrifugiert, um einen Überstand ohne Zellreste zu gewinnen. Von diesem Überstand wurden 10µl jeder Probe mit 30µl Aqua dest. verdünnt (1:4), um die Proteinkonzentration der Proben in einen für die spätere photometrische Messung optimalen Bereich zu senken. Nach kurzem vortexen (MS1, Minishaker von IKA®) wurden dem Gemisch 20µl Probe entnommen und in ein well der Microtiterplatte gefüllt, beginnend in der zweiten horizontalen Reihe. Die Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 50:1 gemischt und zu der Verdünnungsreihe sowie jeder Probe 300µl des Gemisches aus Reagenz A und B pipettiert. Die Microtiterplatte wurde 30 Minuten bei 37°C zur Bildung der Farbkomplexe inkubiert. Die photometrische Messung wurde mit einem Filter von 550 nm durchgeführt (Photometer von Anthos ht II), wobei die Messung nach vorherigem einmaligen Schütteln der Microtiterplatte erfolgte. Die errechneten Proteinkonzentrationen der Proben mit der Einheit µg/µl wurden aufgrund der Verdünnung mit dem Faktor 4 multipliziert. Waren einige Proteinkonzentrationen größer als der durch die Standardkurve abgedeckte Bereich des Photometers, wurde die Messung mit einer stärkeren Verdünnung der jeweiligen Proben (z.B. 1:6) wiederholt. Lagen alle Proteinkonzentrationen in einem für das Photometer meßbaren Bereich wurde 5% Mercaptoethanol (Sigma) zu jeder Probe dazugegeben, um die Disulfidbrücken zu spalten.

#### 3.4.3. Gelelektrophorese und Proteintransfer

In einem "Gel Caster" (Amersham Pharmacia Biotech) wurde ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel (6,9 ml ddH<sub>2</sub>O, 3,75 ml 1,5M Tris pH 8,8, 150 µl SDS 10% , 4,1 ml Acrylamid 30% & 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30, 3029, Roth), 75 µl APS 10% (Ammoniumperoxydisulfate, A-6761, Sigma), 8 µl TEMED (Sigma) und mit 1-Butanol (Merck) überschichtet, um eine gerade Geloberfläche zu erhalten. Mit einem 12,5% Acrylamid-Gel läßt sich am besten eine Proteingröße in der Spanne 10-70 kDa nachweisen, welche in diesem Experiment alle zu detektierenden Proteine bzw. deren Molekulargewichte umfaßt. Nach einer ¾ Stunde war das Gel ausreichend polymerisiert, so daß das Butanol abgegossen und die Reste mit Aqua dest.

ausgewaschen werden konnten. Der "Gel Caster" wurde mit einem 4%igen SDS-Polyacrylamid-Gel (6,2 ml ddH<sub>2</sub>O, 2,5 ml 0,5M Tris pH 6,8, 100µl SDS 10 %, 1,3 ml Acrylamid 30 %, 50 µl APS 10 %, 5 µl TEMED) aufgefüllt und je ein Kamm mit 10 Zinken in das Gel gesteckt. Während einer weiteren  $\frac{3}{4}$  Stunde, in der das Gel polymerisierte, wurden die Proben auf Eis aufgetaut und für die Elektrophorese vorbereitet. Die Proben, eine Positiv- und eine Negativkontrolle für das Tumorsuppressorgen p53 sowie ein Marker (Rainbow<sup>TM</sup>, RPN 756, Amersham Life Science) mit einer high molecular weight range (143000 – 220000) wurden in Mikroröhrchen jeweils so mit einem „Loading-Buffer“ zum Laden und zur Anfärbung (aus 20 ml ddH<sub>2</sub>O, 12,5 ml 0,5M Tris pH 6,8, 10 ml 10% SDS, 2,5 ml 2-Mercaptoethanol, 5 ml Glycerol, 50 µl Bromophenol Blue) gemischt, daß jede Probe die gleiche Menge Protein enthielt. Dabei wurden je nach Proteinkonzentration in der Probe 30-100 µg Protein pro Probe (8µl Marker) benutzt. Dieses Gemisch wurde in die Geltaschen gegeben, wobei die erste Tasche den Marker enthielt, die nächsten Taschen Zelllysate der verschiedenen Behandlungsgruppen. Die letzten Taschen schließlich enthielten eine Negativ- und eine Positivkontrolle für p53. Während der 1½-stündigen Gelelektrophorese (in einem "Mighty Small II von Pharmacia biotech) bei 100V und 4mA wurden die Proteine im Gel aufgetrennt (in einem Puffer aus 6 g Tris, 28,8 g Glycin, Merck, 2 g SDS mit Aqua dest. auf 2 Liter aufgefüllt). In einer Transferkammer (TE 22 Mighty Small Transpher Tank Transfer Unit, Amersham Pharmacia Biotech), mit einem Puffer aus 6,05 g Tris, 28,9 g Glycin, 400 ml Methanol (Merck) mit Aqua dest. auf 2 Liter gefüllt, wurden die Proteine bei 100 V und 400 mA über eine  $\frac{3}{4}$  Stunde auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Life Science) übertragen. Die proteinbeladenen Nitrozellulosemembranen wurden in einer Lösung aus Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS mit  $\frac{1}{1000}$  Tween® 20 (Aldrich) bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

#### 3.4.4. Sichtbarmachung der Proteinbanden

Zur Sichtbarmachung der auf der Membran gebundenen Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit einem für das jeweils zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser konnte sich an das entsprechende Protein anlagern und ein zweiter Antikörper, beladen mit einem photosensiblen Endstück lagerte sich während einer weiteren Inkubation an den ersten Antikörper an. Das photosensible Endstück konnte nun mittels einer chemischen Reaktion aktiviert und

auf einem Röntgenfilm dargestellt werden. Die so ermittelten Proteinbanden gaben Aufschluss über das Vorhandensein und die Konzentration verschiedener Proteine. Während der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Nitrozellulosemembranen in einer Lösung aus 1x PBS mit 5% Trockenmilch (Hipp) und  $1/_{1000}$  Tween® 20 auf dem Shaker (Promax 2020 von Heidolph) mit einer Geschwindigkeit von 125/min bewegt. Zunächst wurden die Membranen gründlich gespült und die Bildung unspezifischer Bindungen an die Proteine auf der Membran verhindert. Ein Wechsel der Lösung erfolgte nach 15 min., nach 5 min. und nach weiteren 5 min.. Eine 1%ige Trockenmilchlösung in PBS wurde hergestellt und der primäre Antikörper gegen ein bestimmtes nachzuweisendes Protein auf der Membran in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:500 je nach Antikörper hinzugegeben. Als primäre Antikörper wurden p53 (p53 Ab-3 [BP53-12], Mouse Mab, IgG<sub>2a</sub>, Cat.-Nr. MS-159-P von NeoMarkers) in einer Verdünnung von 1:500, p21<sup>WAF1</sup> (Ab-1, monoclonal Mouse IgG, Cat.-Nr. OP64-100 UG von Oncogene Research Products Calbiochem®) in einer Verdünnung von 1:300, bcl-2 (purified Mouse Anti-Human IgG<sub>1</sub>, Cat.-Nr. 65111A von PharMingen) in der Verdünnung 1:300 und  $\beta$ -Actin (monoclonal anti- $\beta$ -Actin, Mouse Ascites Fluid IgG<sub>1</sub>, Cat.-Nr. A5441 von Sigma) in der Verdünnung 1:700 verwendet. Dieser Antikörper in Lösung wurde nach Abgießen der 5%igen Milchlösung auf die Membranen gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur und 130 Shakes/min. inkubiert. Die Membranen wurden wiederum in der 5%igen Trockenmilchlösung gespült, mit einem Wechsel der Lösung nach 15 min., 5 min. und 5 min.. Als sekundärer Antikörper wurde HRP-konjugierter Antikörper (ImmunoPure®, anti-goat, mouse IgG, (H+L), Cat.-Nr. 31430 von Pierce) benutzt, der in 2 ml Aqua dest. gelöst wurde und so eine Konzentration von 0,8 mg/ml enthielt. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:5.000 verwendet. Auch der sekundäre Antikörper wurde in eine 1%ige Trockenmilchlösung in PBS gegeben und mit den Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Shaker mit 130/min. inkubiert. Nach Entfernung des sekundären Antikörpers wurden die Membranen wiederum mit einer 5%igen Milchlösung dreimal jeweils eine Viertelstunde gespült, um eine unspezifische Bindung überschüssigen Antikörpers zu verhindern. Die Lagerung sowohl der primären als auch der sekundären Antikörper erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.. Zur späteren Detektion auf einem Röntgenfilm wurden jeweils 5 ml beider Lösungen aus dem ECL-Kit (ECL<sup>TM</sup> Western blotting analysis system, Cat.-Nr. RPN 2108 von Amersham Pharmacia Biotech) gemischt, die nach einer Minute im Dunkeln

polymerisieren und die Membranen nacheinander für jeweils eine Minute im Dunkeln zum Ablauf einer chemischen Reaktion in dieses Gemisch gelegt. Im alkalischen Milieu katalysiert die auf dem sekundären Antikörper gebundenen horse radish peroxidase die Oxidation von in den Lösungen enthaltenem Luminol. Dieses gelangt dadurch in einem angeregten Zustand und sendet Licht der Wellenlänge 428 nm aus.

Anschließend wurden die Membranen mit einem Papiertuch getrocknet und einzeln in Klarsichtfolie (Haft-Folie der Bartling-Werke) verpackt in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein für diese Lichtemission sensibler Film (Biomax ML 18x24 cm, Cat.-Nr. 819 4540 von Kodak) in die Kassette eingelegt und mit einer Belichtungszeit von 2 min. begonnen. Nach Entwicklung dieses Films in einem Filmentwickler (45 compact, PROTEC, Processor-Technology) wurde die weitere Belichtungszeit, falls nötig, nach der Stärke des Signals auf dem Film variiert. Die Belichtungszeiten richteten sich zum einen nach der Menge des geladenen Proteins, zum anderen aber auch danach, welcher primäre Antikörper verwendet wurde. So variierten sie von wenigen Sekunden (z.B. für die Anfärbung durch  $\beta$ -Actin) bis zu einer Dreiviertelstunde (z.B. bei Verwendung von p21 als primären Antikörper).

Auf die Filme wurden die Markierungsbanden für die Proteingewichte von 220 kDa, 97,4 kDa, 66 kDa, 46kDa, 30kDa, 21,5 kDa und 14,3 kDa von der jeweiligen Membran übertragen. So konnte das Proteingewicht, das den Proteinbanden auf dem Film zugrunde liegt in seiner Größenordnung eingeordnet und auf seine Richtigkeit überprüft werden.

Alle Western Blot Untersuchungen wurden mindestens dreimal wiederholt und bestätigt.

### **3.5. AST-Messung:**

Zur Einschätzung des Ausmaßes der Zellschädigung in den Behandlungsgruppen wurde das zelleigene Enzym Aspartataminotransferase (AST) mittels eines Test Kits von Sigma photometrisch bestimmt. Zur Erstellung einer Standardreihe wurde eine Multienzymsubstanz von Sigma verwendet. Alle Reagenzien sowohl ungelöst als auch gelöst wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Zunächst wurden die Reagenzien zur AST-Bestimmung vorbereitet; Reagenz A wurde in 10 ml Aqua dest., Reagenz B in 16 ml Aqua dest. und die Multienzyme in 3



ml Aqua dest. (entspricht 1130 U/l) gelöst. Zu Reagenz A wurden 0,8 ml Reagenz B gegeben und gevortext. Aus der Multienzymlösung wurde eine Standardreihe erstellt, indem für den Standard mit der höchsten Konzentration (141,25 U/l) die Multienzymlösung 1:8 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt wurde. Weitere 6 Standards wurden in einer Verdünnungsreihe mit sich jeweils halbierender Konzentration in der Verdünnung 1:2 mit 0,9%iger NaCl-Lösung erstellt.

Die Belegung der Microtiterplatte erfolgte mit jeweils 50 µl 0,9%iger NaCl-Lösung als Leerwert an den ersten beiden Positionen, dann folgten je 50 µl der Standards jeweils doppelt nebeneinander in den ersten beiden Wells der jeweiligen Reihe und insgesamt in aufsteigender Konzentration vertikal untereinander in den ersten beiden senkrechten Reihen angeordnet.

Die Proben der zentrifugierten Zellüberstände wurden nun auf Eis aufgetaut und je 50 µl jeder Probe in die Wells gegeben, an Position 3 der ersten Reihe beginnend.

Da es sich bei der Enzymbestimmung um eine kinetische Messung handelt, wurden die 200 µl pro well des A/B-Gemisches mittels einer Multichannelpipette (Eppendorf) möglichst zügig auf die Standards und Proben gegeben. Die photometrische Messung wurde mit einem Filter von 340nm durchgeführt, wobei die erste Messung nach einer Wartezeit von 30s zum Ausgleich unterschiedlicher Reaktionszeiten in den einzelnen wells und die zweite Messung nach 10 min. erfolgte. Die Enzymkonzentrationen wurden in U/l angegeben. Auch diese Untersuchungen wurden dreimal wiederholt und ergaben jeweils dasselbe Resultat.

### **3.6. Apoptosenachweis mittels Fluoreszenzfarbstoff**

Die Zellen aller Karzinom-Zelllinien wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  pro Kammer in Chamber Slides (NUNC) im entsprechenden Medium ausgesetzt. Nach drei Tagen folgte analog zu den Western-Blot-Analysen die Behandlung der Zellen. Nach zweitägiger Behandlungszeit wurden im Phasenkontrastmikroskop an zufällig ausgewählten Stellen Nativaufnahmen der Zellen der verschiedenen Behandlungsgruppen mit einer Vergrößerung von 32x und einer Verschlusszeit von  $\frac{1}{2}$  bzw. einer Sekunde angefertigt.

Zum Fixieren der Zellen wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, um vorhandene apoptotische Zellen nicht abzulösen, die Zellen vorsichtig zweimal in 1x PBS gewaschen und mit 4%igem Paraformaldehyd (aus 95% Paraformaldehyd (Aldrich))

bedeckt. Nach einer Fixationszeit über Nacht bei 4°C wurde das Paraformaldehyd abgesaugt und die Zellen erneut zweimal mit 1x PBS gewaschen.

Zur Anfärbung der Zellen wurde der Hoechst-Farbstoff B-2261 (Hoechst-Nr. 33342, Cat.-Nr. B-2261 von Sigma) benutzt. Zur Erstellung der Färbelösung wurde der Farbstoff 1:100 mit 0,1x PBS verdünnt, um eine Konzentration von 1 mg/ml zu erreichen. Für die 8 Kammern eines Chamber Slides wurden 25µl dieser Lösung benötigt, dazu wurden 75µl 0,1 X PBS gegeben, das Gemisch gevortext und 400µl Glycerol hinzugefügt. Nach guter Durchmischung wurde von diesen 500µl Färbelösung 60µl in jede Kammer gegeben, um die Zellen gleichmäßig zu bedecken. Die so behandelten Chamber Slides wurden im Dunkeln und bei Raumtemperatur für 15 min. inkubiert. Anschließend wurde der Farbstoff abgesaugt und zweimal mit 1 X PBS gewaschen, um überschüssige Farbstoffreste zu entfernen. Nach möglichst vollständiger Entfernung des PBS aus allen Kammern wurden die Kammeraufsätze der Chamber Slides von dem darunter liegenden Objektträger abgehoben. Zur Konservierung wurde Medium aus 80% Glycerin, 20% 1x PBS und einer Spatelspitze Natriumacid reinst (Merck) auf den Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Gelagert wurden diese Objektträger lichtgeschützt bei -20°C.

Die vier zweifach vorhandenen Behandlungsgruppen auf einem Objektträger wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit einem DAPI-Filter betrachtet. Von den Zellen jeder Behandlungsgruppe wurden an mehreren zufällig gewählten Stellen Aufnahmen gemacht, um die angefärbten Kerne gesunder wie auch apoptotischer Zellen darstellen und fotografieren zu können. Gezählt wurden geblindet mindestens 500 Zellen pro Behandlungsgruppe von zwei unabhängigen Untersuchern. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen wurde ausgerechnet und graphisch dargestellt. Bei der Zellzählung der gesunden sowie der apoptotisch veränderten Zellen wurden sie getrennt nach "gesund" und "apoptotisch" gezählt, wobei als Apoptose jede sichtbare Kernveränderung von beginnender Einfurchung und Abschnürung von Kernfragmenten bis hin zu einer vollständigen Auflösung des Kerns in Bruchstücke gewertet wurde. Die Bildverarbeitung erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm „ISIS“. Dieses Experiment wurde insgesamt dreimal wiederholt.

### **3.7. Immuncytologischer Apoptosenachweis**

Die Aussaat der Zellen der Tumor-Zelllinien sowie frischer humaner Hepatozyten erfolgte in Chamber Slides wie für die Fluoreszenzfärbung beschrieben. Das Medium wurde vorsichtig aus den Kammern entfernt ohne die Zellen vom Grund zu lösen und eventuelle Rückstände durch Waschen mit 1x PBS beseitigt. Durch Zugabe von gepuffertem 6% Formaldehyd (J.T. Baker) mit pH 7,4 wurden die Zellen über Nacht bei 4°C fixiert. Dann das Formaldehyd entfernt und gründlich mit 1 X PBS (pH-Wert 7,4) ausgespült. Nach vollständigem Absaugen des PBS wurden die Chamber Slides bei Raumtemperatur getrocknet und konnten so bis zur Färbung gelagert werden.

#### **3.7.1. Immunfluoreszenz-Färbungen:**

Zum Nachweis einer Induktion von Apoptose wurden verschiedene Färbetechniken angewandt und mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie betrachtet. Zunächst wurden die Chamber Slides mit 70%igem Ethanol eine Stunde permeabilisiert, dann eine unspezifische Bindung durch Waschen mit TNB-Puffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% bovine serum albumin, 0,5% sodium-azide (Amersham), pH 7,5) verhindert. Dann wurden einige Zellen mit dem ersten Antikörper anti-Apo-2.7 (Verdünnung 1/10 in TNB-Puffer, von Immunotech Marseille) eine Stunde bei 22°C inkubiert. Es erfolgten fünf Waschvorgänge und eine einstündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper, HRP-konjugierten rabbit anti-mouse-IgG (Verdünnung 1/50 in TNB-Puffer, von DAKO, Hamburg). Nach fünf weiteren Waschzyklen wurde Tyramide Signal Amplification (TSA-Indirect NEM<sup>TM</sup>, Verdünnung 1/40 von Life Science Products, Boston) für 15 min. hinzugegeben. Es folgten fünf Waschvorgänge und eine einstündige Inkubation mit fluorescein-konjugiertem Streptavidin (Verdünnung 1/50 in TNB-Puffer, DAKO, Hamburg). Zum Schluß wurden die Nuclei mit Propidiumjodid (Sigma; 100 µg/ml PBS) bei Raumtemperatur im Dunkeln gegengefärbt und die Zellen mit PBS gewaschen sowie anschließend mit ddH<sub>2</sub>O gespült.

Ein anderer Teil der Zellen wurde nach der Blockierung unspezifischer Bindungen eine Stunde mit biotinyliertem Annexin V (Hözel Diagnostika, Köln) mit einer Verdünnung von 1/10 in TBS (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 40, pH 7,5) inkubiert. Dann wurden sie dreifach mit TNT (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 40, pH 7,5) gewaschen und eine weitere Stunde mit Streptavidin-PE (Verdünnung 1/100 in TNB mit 2 mM CaCl<sub>2</sub>, von

Immunotech, Marseille) inkubiert. Nach drei weiteren Waschzyklen mit TNT-Puffer (mit  $\text{CaCl}_2$ ) wurden die Nuclei mit Bisbenzimid (Hoechst 33258, Sigma, München) gegengefärbt.

Ein dritter Teil der Zellen wurde mit dem „TUNEL-Reaktionskit“ APO-DIRECT™ (Pharmingen, San Diego) angefärbt. Zunächst wurden die Zellen zwei Stunden mit 70%igem Ethanol permeabilisiert und zweifach mit PBS gewaschen. Dann wurde 50,75  $\mu\text{l}$  TUNEL-Reagenz (10  $\mu\text{l}$  TdT-Reagenz, 0,75  $\mu\text{l}$  TdT Enzym, 8  $\mu\text{l}$  FITC-dUTP, 32  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O) auf die Monolayer gegeben und drei Stunden bei 37°C im Brutschrank und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen zweimal mit PBS und zweifach mit dem im APO-DIRECT™-Kit enthaltenen Puffer gewaschen. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung der Nuclei mit Propidiumjodid bei Raumtemperatur im Dunkeln und ein weiterer Waschvorgang mit PBS sowie eine Spülung mit ddH<sub>2</sub>O.

Nach dem Trocknen der angefärbten Zellen wurden sie unter einem Fluoreszenz Mikroskop (C. Zeiss, Oberkochen, Deutschland, ausgestattet mit Epilumination) beobachtet und fotografiert. Die unterschiedlichen Anfärbungen zeigten verschiedene Fluoreszenzen: Apo2.7 emittierte gelb-grünes Licht, eine Bindung an Annexin zeigte sich durch rotes Licht und bei der TUNEL-Reaktion wurde eine gelbe Fluoreszenz sichtbar. Um die Intensitäten der verschiedenen Färbungen untereinander vergleichen zu können, wurden in jedem Apoptose-Test die angefärbten Zellen mit der gleichen Dauer unter dem Mikroskop betrachtet.

Zur TUNEL-Färbung der Pankreaskarzinomzellen MIAPaCa-2, PaTu 8902, PaTu 8988t und PaTu 8988s wurden die Zellen ebenfalls in Chamber slides in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  aufgesetzt. Nach zweitägiger Behandlung mit 1,5  $\mu\text{M}$  2-ME (MIAPaCa-2), 2,0  $\mu\text{M}$  2-ME (PaTu 8902 und PaTu 8988t) und 10  $\mu\text{M}$  2-ME (PaTu 8988s) wurden die Zellen mit Ethanol und Aceton im Verhältnis 1:1 für 20 min. bei -20°C fixiert. Danach wurde die endogene Peroxidase mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthaltendem Methanol für 15 min. bei Raumtemperatur blockiert. Die Proben wurden mit 0,1% Triton X-100 und 0,1% Natriumzitat für 2 min. bei 4°C inkubiert. Als positive Kontrolle diente eine Vorbehandlung mit 0,25 IE/L DNase I für 20 min. Es folgte die Inkubation der Kontrollen und der behandelten Zellen mit TdT Puffer [30mM Tris (pH 7,2), 140mM Natriumcacodylat und 1mM Kobaltchlorid]. Bedeckt wurden die Zellen mit 100IE/ml TdT (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) und 0,2nM biotinyliertem 16-dUTP (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) für 2 Stunden bei 37°C. Die

Reaktion wurde mit einer Inkubation in Transfer-Puffer (300mM Natriumchlorid und 30mM Natriumzitat) für 30 min. bei Raumtemperatur beendet. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Proben mit 2% BSA für 10 min. bei Raumtemperatur behandelt. Danach folgte die Inkubation mit 1:10 peroxidasekonjugiertem Streptavidin (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) für 30 min. bei Raumtemperatur, eine weitere Waschung mit PBS und eine Färbung mit Diaminobenzidin für 2 min. bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden mit Harris Hämatoxin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) gegengefärbt. Braune Zellen wurden als apoptotisch angesehen. Eine Mindestzahl von 500 Zellen pro Behandlungsgruppe wurden ausgezählt und die mittlere Anzahl der apoptotischen Zellen errechnet. Analog dazu erfolgte die Färbung der Mausebern nach Leberresektion. Der einzige Unterschied war eine zuvor notwendige Deparaffinisierung der Schnitte. Die Ergebnisse stammen aus Versuchen, die dreimal wiederholt wurden.

### **3.8. Zellzyklusanalysen**

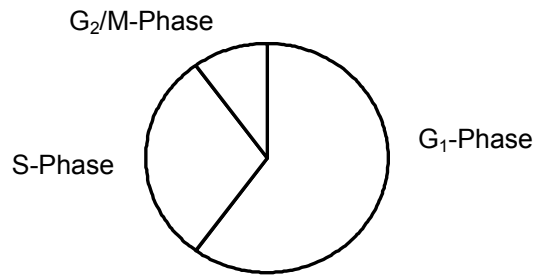
Um eine Aussage über die Zellverteilung in den verschiedenen Zellzyklusphasen zu erhalten, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt, denn 2-ME beeinflusst den Zellzyklus auf unterschiedliche Weise unter anderem durch eine Stabilisierung des p53 Proteins. Auch der Nachweis apoptotischer Zellen mit Quantifizierung ist möglich.

Die Zellen wurden mittels einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt und in 6 cm-Petrischalen (Falcon) in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  pro Platte ausgesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS, MEC oder 2-ME behandelt. Die Dosis 2-ME richtete sich nach den Ergebnissen der Proliferationsanalysen. Die Dosis, die eine Wachstumshemmung von 50% bewirkte ( $IC_{50}$ ), wurde verwendet. Somit erhielten die Zelllinien Hep 3B, Hep G2 und PLC/PRF/5 eine Dosis von 5 $\mu$ M Kontrollöstrogen 16 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -estradiol, sowie 2,5 $\mu$ M und 5,0 $\mu$ M 2-ME. Die etwas sensiblere Zelllinie SK-Hep 1 wurde mit PBS, 3 $\mu$ M MEC, 1,5 $\mu$ M 2-ME oder 3,0 $\mu$ M 2-ME behandelt. Bei den Pankreaskarzinomzellen betrug die Dosis 1,5 $\mu$ M MEC oder 2-ME für MIAPaCa-2 Zellen, 2,0 $\mu$ M MEC oder 2-ME für PaTu 8902 und PaTu 8988t und 10 $\mu$ M MEC oder 2-ME für PaTu 8988s Zellen. Die Platten wurden für weitere 48 bzw. 72 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, dann erfolgte die Ernte enzymatisch mit 0,25% Trypsin. Die Zellen sollten durch die Manipulation nicht beschädigt werden. Nach Ablösung der Zellen wurden sie wiederum zweimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Fixierung der Zellen für 60 min. in 70%igem Ethanol bei 4° C. Nach einem Waschvorgang mit PBS erhielten die Zellen 10µg/ml RNase (Typ 1-A von Sigma, zuvor bis 100°C erhitzt, um DNase zu inaktivieren). Danach wurden sie resuspendiert und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde eine PBS-Lösung mit 50µg/ml von dem DNA-spezifischen Fluorochrom Propidiumjodid hinzugegeben und die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bis zur Messung in Dunkelheit aufbewahrt.

Propidiumjodid gehört zu der Klasse der interkalierenden Fluorochrome, die sich periodisch zwischen die Basenpaare der DNA einfügen. Da sie sich auch in Doppelsträngige RNA einlagern ist eine vorherige Behandlung mit RNase notwendig. Gesunde somatische Zellen machen einen Zellzyklus bestehend aus G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase durch (Abbildung 2). Nach der Mitose folgt die G<sub>1</sub>-Phase, eine Wachstumsphase, aber ohne Synthese von Chromatin. Diese erfolgt in der Synthesephase, der S-Phase, hier wird die komplementäre DNA erstellt. Daran schließt sich eine Ruhephase ohne weitere Synthese an, die G<sub>2</sub>-Phase. Zur weiteren Replikation erfolgt wiederum eine Mitose. Ein Zellzyklus dauert in Säugerzellen etwa 22 Stunden. Die Zellen können sich auch direkt aus der G<sub>1</sub>-Phase in die G<sub>0</sub>-Phase, die Ruhephase, als Dauergewebszelle weiterdifferenzieren. Unter bestimmten Umständen können sie erneut proliferieren.

Da die Zellen nicht alle synchron ihren Zellzyklus durchlaufen, werden sie bei der Zellzyklusanalyse in unterschiedlichen Phasen angetroffen. Die meisten Zellen lassen sich in der G<sub>1</sub>-Phase finden, da diese zeitlich am längsten dauert, gefolgt von der etwas kürzeren S-Phase. Es lassen sich weniger Zellen in der wesentlich kürzeren G<sub>2</sub>-Phase bestimmen und nur einige vereinzelte Zellen in der von allen am kürzesten Mitose-Phase.



### **Abbildung 2**

Normaler Zellzyklus somatischer Zellen mit den verschiedenen Phasen. G<sub>1</sub>-Phase ( $2n$  DNA): RNA und Proteine werden synthetisiert, nicht jedoch DNA. S-Phase ( $2 \rightarrow 4n$  DNA): DNA Synthese. G<sub>2</sub>-Phase ( $4n$  DNA): Tetraploider Chromosomensatz komplett. M-Phase ( $4n \rightarrow 2n$  DNA): Zellteilung. (G = Gap = keine DNA-Synthese; S = DNA-Synthese; M = Mitose).

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen wurde eine Zytometrie-Analyse am zweiten und dritten Tag nach der Behandlung mit 2-ME (FACS) durchgeführt (El-Naggar et al. 1992). Es wurden pro Zelllinie 10.000 Zellen der HCC Zelllinien in einem Calibur flow cytometer von Becton-Dickinson (ausgestattet mit einem einzelnen 488-nm Argon-Ionenlaser und an einen Macintosh Quadra 650 Computer angeschlossen) analysiert (Weber et al. 2000). Die Pankreaskarzinomzelllinien wurden in einem EPICS Profile II flow cytometer (Coulter Corp., Hialeah, FL, USA) prozediert und die Daten anschließend mit dem Coulter Cytological program analysiert. Die grüne Fluoreszenz (FITC) wurde durch einen 530/30-nm band-pass Filter, die rote Fluoreszenz (Propidiumjodid) durch einen 582/42-nm band-pass Filter gesammelt. In den Zellzyklusanalysen wurde der DNA-Gehalt jeder einzelnen Zelle bestimmt und in den Graphiken entlang der Abszisse aufgetragen. Mit „M1“ sind die Zellen bezeichnet, die nur wenig DNA enthalten, welches mit einer DNA-Fragmentation korreliert. Dieses ist ein charakteristisches Zeichen der Apoptose. Unter „M2“ sind die Zellen mit einem haploiden Chromosomensatz in der G<sub>1</sub>- und beginnenden S-Phase zusammengefaßt. Bei gesunden Zellen befinden sich die meisten in diesem Zyklusabschnitt. Die übrigen in den Graphiken repräsentierten Zellen weisen einen hohen DNA-Gehalt auf, sie haben die Synthesephase bereits durchlaufen und haben einen tetraploiden Chromosomensatz. Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt.

### 3.9. Tierversuche

#### 3.9.1. Beschreibung und Haltung der Tiere

Die Verwendung und Haltung der Tiere erfolgte jeweils nach Genehmigung des Tierversuchsantrages der jeweiligen zuständigen Behörden. Die Haltung entsprach ebenfalls den örtlichen Bestimmungen. 4-6 Wochen alte weibliche athymische Nacktmäuse (Charles River, Hannover, Deutschland [Hep 3B Zellen]; Charles River, Wilmington, MA, USA [MIAPaCa-2 und A549 Zellen]) waren geeignete Tiere. Sie besitzen einen genetischen Defekt eines rezessiven Gens auf Chromosom 11 und haben dadurch keinen Thymus entwickelt, was annähernd keine zellvermittelte immunologische Abstoßungsreaktion gegenüber körperfremden Zellen zur Folge hat. Fremde Tumorzellen können sich daher gut in ihrem Körper einnisten und proliferieren. Um das Immunsystem weiter zu supprimieren, wurden die Tiere vor der Injektion der Pankreaskarzinom- und die Bronchialkarzinomzellen mit 350 cGy unter einer  $^{137}\text{Cs}$  Quelle bestrahlt. Am darauffolgenden Tag waren die Zellen auf 70-80% konfluierend herangewachsen, so daß die Zellinjektion erfolgen konnte. Nach enzymatischer Ablösung der Zellen mit Trypsin und Waschung mit HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) wurde die Anzahl der Zellen pro Volumeneinheit ermittelt und in die richtige Zellzahl pro Volumen zur Zellinjektion gebracht. Verschiedene Tiermodelle wurden als geeignet angesehen.

#### 3.9.2. Hepatozelluläres Karzinom

Zur Induktion von Tumoren, die vom HCC stammen, verwendeten wir die Zelllinie Hep 3B, die in Nacktmäusen anwächst und Tumoren bildet, wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Hahn et al. 1982, Curtin et al. 1986). Da die Zellen nicht in der Leber selbst wachsen und somit ein orthotopes HCC Tumormodell nicht zur Verfügung steht, entschlossen wir uns für eine subcutane Injektion, um subcutane Tumoren zu erzeugen. Der Vorteil dieses Tumormodells ist die einfache Handhabung der Zellinjektion, ein gutes kontinuierliches Monitoring der Wachstumsdynamik der Tumoren und die Möglichkeit, den Versuch rechtzeitig abubrechen, falls Tumoren ungewöhnlich rasch zu einer nicht tierschutzgerechten Größe heranwachsen.  $2 \times 10^6$  Hep 3B Zellen wurden in 100µl PBS suspendiert und subcutan in die linke kaudale Flanke von 20 Mäusen mit einer 27G Kanüle injiziert. Drei Tage nach der Injektion wurden die Tiere randomisiert, indem sie für 5 Minuten in einen gemeinsamen Käfig



gebracht und anschließend wieder in zwei zufällig zusammengestellte Gruppen mit jeweils 10 Tieren aufgeteilt wurden. Zur Herstellung der 2-ME enthaltenden Lösung wurden 50 mg 2-ME in 500µl DMSO (Dimethylsulfonamide, Sigma) gelöst und dann zur besseren oralen Verabreichung mit 2000µl Olivenöl verdünnt, um eine Lösung von 1mg 2-ME in 50µl Lösung zu erhalten. Ab dem dritten Tag nach Zellinjektion erfolgte die Fütterung der Tiere mit einer Knopfkanüle, die in den Rachen eingeführt wurde. 50µl, die entweder 1mg 2-ME oder lediglich DMSO und Olivenöl enthielten, wurden täglich bis zum 32. Tag nach Zellinjektion verabreicht. Ab dem 20. Tag nach Tumorzellinjektion wurde die subcutane Tumorgroße jeder Maus alle zwei Tage in zwei Ebenen gemessen und die Tumorausdehnung in die dritte Ebene aus dem Mittelwert der anderen beiden Ebenen abgeschätzt. Die Berechnung der jeweiligen Tumorgroße erfolgte nach der Formel  $\frac{4}{3} \pi r^3$  zur Berechnung eines Kugelvolumens unter der Annahme, daß die dreidimensionale Tumorausdehnung der Gestalt einer Kugel ähnelt. Nach Beendigung der Versuche am 32. Tag wurden alle Tiere durch Überdosis einer Narkose mit Halothan (Sigma) und zusätzlicher zervikaler Dislokation getötet. Dieser Versuch wurde nach den Richtlinien des Tierschutzbeauftragten nur einmal durchgeführt und mit dem Student's *t*-Test die Signifikanz errechnet.

### 3.9.3. Pankreaskarzinom

Die MIAPaCa-2 Zellen wachsen in der Lunge nach intravenöser Verabreichung.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden in 100µl PBS suspendiert und in die Schwanzvene der Nacktmäuse injiziert. Die Zellmenge war ausreichend, um in allen Tieren multiple Lungenmetastasen zu induzieren und gering genug, um keine letale Lungenembolie auszulösen. Die Randomisierung erfolgte nach drei Tagen, wonach sie wieder zufällig in zwei Gruppen mit jeweils 10 Tieren aufgeteilt wurden. An diesem Tag begann die Therapie analog zur Behandlung der HCC tragenden Tiere. Die Therapiegruppe erhielt 1mg 2-ME in 50µl Lösung pro Tier täglich per os. Die Kontrollgruppe erhielt ebenfalls 50µl der gleichen Lösung, jedoch ohne 2-ME Zusatz. Der Behandlungszeitraum betrug 21 Tage, wonach die Tiere durch Überdosis einer Narkose mit Halothan (Sigma) und zusätzlicher zervikaler Dislokation getötet wurden. Im Anschluß daran wurde in die Lungen über die Trachea 1ml pro Maus 15%ige India Ink Lösung injiziert, um das Lungenparenchym mit schwarzer Tinte zu füllen. Dadurch hatten die Lungen ein volles Volumen, so daß die Oberfläche aufgespannt

erschien. Die weißen Tumorknoten färben sich hierdurch nicht an und sind somit durch den hohen Farbkontrast sehr gut zu erkennen und zu untersuchen. Die entnommenen Lungen wurden in Fekete's Lösung (60% Äthanol, 3% Formaldehyd und 4% glacial Essigsäure) fixiert. Die Gesamtzahl der Tumorknoten auf der Oberfläche von jeweils 5 Lungenlappen wurde unter einem Stereoskop durch zwei unabhängige Untersucher ohne Kenntnis der Behandlungsgruppe ermittelt. Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's *t*-Test berechnet.

#### 3.9.4. Bronchialkarzinom

A549 Zellen wurden in einer Menge von  $2 \times 10^6$  in die Schanzvenen von Nacktmäusen analog zur Injektion der MIA PaCa-2 Zellen gespritzt. Die Fütterung mit 2-ME begann 5 Tage nach Zellinjektion in einer Dosis von 1mg pro Maus in 50µl Lösung bis zum Ende des Versuchs am 21. Tag nach Zellinjektion. Das Wild-Typ p53 oder das Lac-Z exprimierende Adenovirus wurde in einer Menge von jeweils  $5 \times 10^9$  pfu (Plaque forming units) an den Tagen 5, 7 und 9 nach Zellinjektion in die Schwanzvene injiziert. Nach 21 Tagen wurden die Tiere durch Überdosis mit Halothan und zusätzlicher zervikaler Dislokation getötet. Eine Injektion von India Ink Lösung über die Trachea und Fixierung der Lungen in Fekete's Lösung erfolgte analog zu dem Procedere wie bei der Beschreibung für die Pankreaskarzinomzellen. Die Kolonien auf der Oberfläche aller 5 Lungenlappen wurden von zwei unabhängigen Untersuchern ohne Kenntnis der zugehörigen Behandlungsgruppe ausgezählt. Der Versuch zur Zählung der Lungenkolonien wurde dreimal wiederholt, und die statistische Signifikanz mit dem Student's *t*-Test errechnet.

#### 3.9.5. Leberresektion zur Proliferationsuntersuchung

20 weibliche Nacktmäuse wurden in 4 zufällig bestimmte Gruppen unterteilt. Davon erhielten 10 Mäuse zwei Tage lang jeweils 1mg pro Maus 2-ME per os. Die Zubereitung und die Menge an 2-ME erfolgte analog zum Procedere wie für das hepatozelluläre Karzinom beschrieben. Am dritten Tag wurde 2-ME weiter verabreicht, und die beiden Gruppen wurden weiter in jeweils zwei Gruppen unterteilt. Davon unterzogen wir die eine Hälfte einer zweidrittel Leberresektion über eine Laparotomie in Vollnarkose. Die andere Hälfte wurde ebenfalls laparotomiert,

jedoch ohne Leberresektion. Somit entstanden vier Gruppen. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt.

- |                    |              |
|--------------------|--------------|
| 1. Keine Resektion | Kein 2-ME    |
| 2. Keine Resektion | 2-ME 1mg/die |
| 3. Leberresektion  | Kein 2-ME    |
| 4. Leberresektion  | 2-ME 1mg/die |

Die 2-ME Gabe wurde weitere 2 Tage fortgesetzt, wonach die Tiere durch Halothan Überdosis und zusätzlicher zervikaler Dislokation getötet wurden. Die Lebern wurden entnommen und in Formalin fixiert, um dann in Paraffin für weitere Untersuchungen eingebettet zu werden.

### **3.10. Immunhistochemie**

Immunhistochemische Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Gefäßdichte innerhalb der Lungenmetastasen der MIAPaCa-2 Zellen messen zu können. Geprüft wurde ein eventueller antiangiogenetischer Effekt durch 2-ME. Weiterhin wurden Schnitte von Lungenmetastasen der A549 Zellen durchgeführt, um eine eventuelle Stabilisierung des p53 Proteins durch 2-ME nachzuweisen. Außerdem sollte die Größe der einzelnen Tumorknoten auf diese Weise miteinander verglichen werden. Bei den Untersuchungen der Mauslebern nach in vivo Behandlung mit 2-ME nach Leberresektion sollte eine eventuelle Induktion von Apoptose der Hepatozyten durch 2-ME während der Leberregenerationsphase mit Proliferation von Hepatozyten nachgewiesen werden. Es kamen zwei verschiedene Techniken zum Einsatz. Die Lungenmetastasen aus MIAPaCa-2 Zellen wurden an Gefrierschnitten untersucht. Hingegen war bei den Lungenmetastasen der A549 Zellen und bei den Mauslebern die Paraffineinbettung die bessere Methode.

#### **3.10.1. Gefrierschnitte**

Nach der Tötung der Tiere wurden die entnommenen Lungen mit den MIAPaCa-2 Zellen zum Nachweis der Angiogenese für Gefrierschnitte vorbereitet. Auch Lungen mit Metastasen von A549 Zellen wurden analog gefärbt. Dazu wurden die Lungen in OCT (Miles Inc., Elkhart, IN, USA) eingebettet und auf Trockeneis gelegt, bis die Proben gefroren waren. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die so entstandenen

Blöcke bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach der Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die Proben mit 5% Ziegenerum und 1% Pferdeserum geblockt. Danach wurden die Schnitte mit dem Ratten Anti-Maus Antikörper CD31 (PECAM-1, PharMingen, San Diego, CA, USA) bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. CD31 befindet sich selektiv in Endothelzellen, so daß man gezielt die Endothelien der Gefäße darstellen kann. Als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase konjugierter Anti-Ratte IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, USA) verwendet. CD31 wurde mit Diaminobenzidine sichtbar gemacht. Die Anzahl der Gefäße in einer Gesamtmenge von 30 Tumorknoten pro Behandlungsgruppe wurde ausgezählt und deren Mittelwerte verglichen.

### 3.10.2. Paraffinschnitte

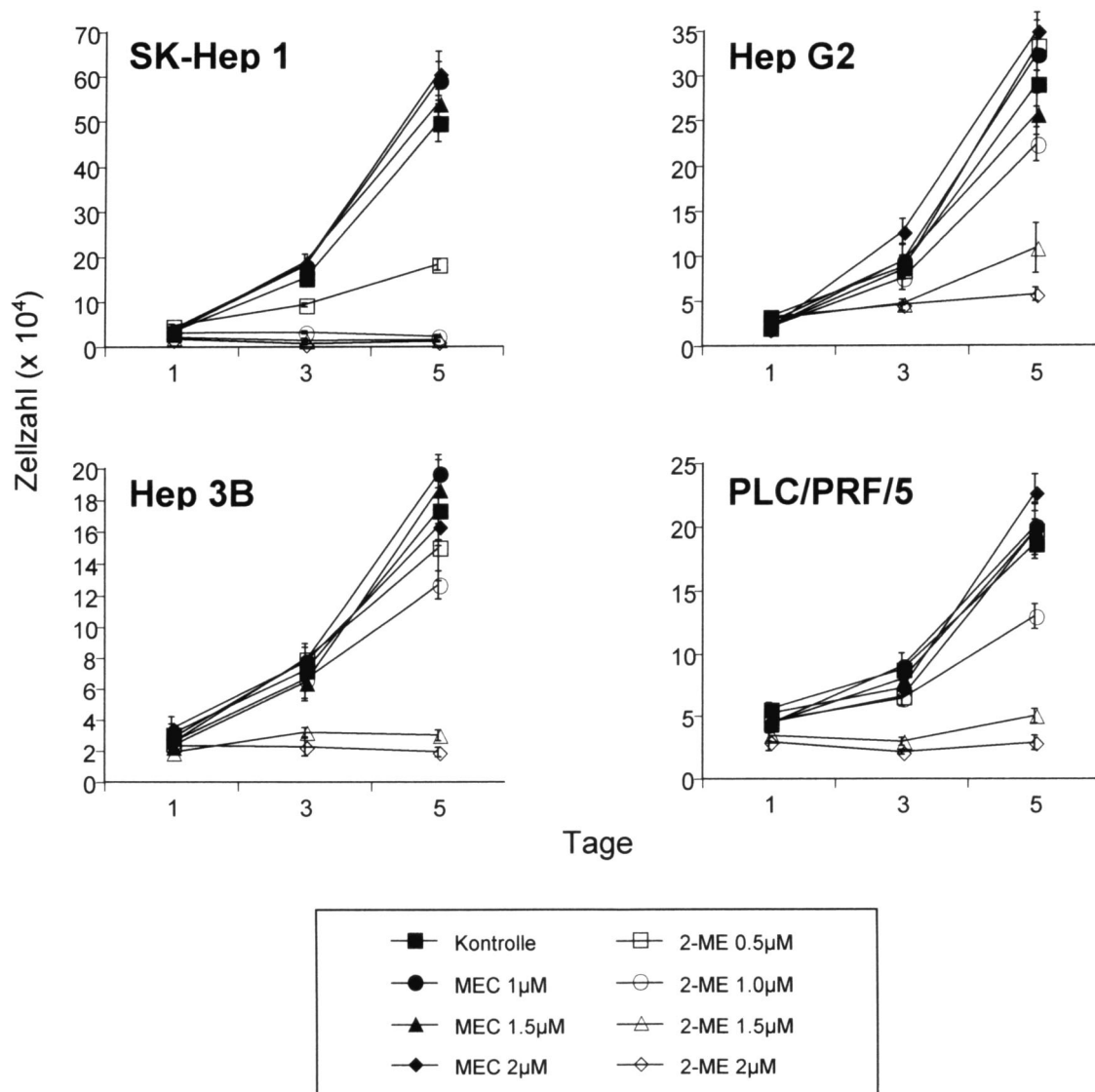
Die Lungen mit den A549 Kolonien zum Nachweis der Apoptose bzw. zum Nachweis der p53 Expression nach Behandlung mit 2-ME und dem p53 exprimierenden Adenovirus wurden in Formalin 3% fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Analog dazu wurde bei der immunhistochemischen Färbung der Mauslebern für PCNA beim Leberresektionsversuch verfahren. Nach Anfertigung der Schnitte wurden die Proben mit zusammengemischtem Maus Anti-humanem p53 (DO-7, PharMingen, San Diego, CA, USA) und biotinyliertem Antimaus-Immunglobulin (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA) gemeinsam über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um Komplexe aus primärem und sekundärem Antikörper zu bilden. Danach ergänzten wir 0,1% hitzeinaktiviertes normales Mausserum (Sigma, St. Louis, MO, USA) für 2 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Nach der Deparaffinisierung und Blockierung mit 1%iger fettfreier Milch wurden die Schnitte mit Komplexen aus primärem und sekundärem Antikörper für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte mit Streptavidin, welches an Horseradish Peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA) konjugiert ist, inkubiert. Die Sichtbarmachung erfolgte mit Diaminobenzidine, die Gegenfärbung mit 0,4% Methylgrünlösung.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. 2-ME zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms (HCC)

#### 4.1.1. Wachstumshemmung durch 2-ME beim HCC

Die vier verwendeten Zelllinien zeigten eine dosisabhängige Wachstumshemmung durch 2-ME (Abbildung 3).

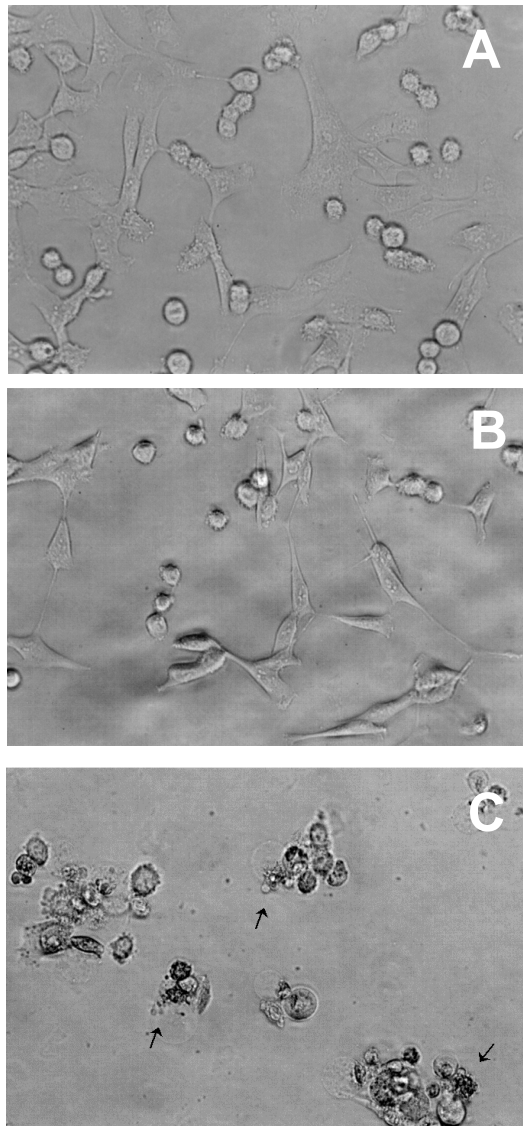


**Abbildung 3**

Proliferationsanalysen der vier verwendeten HCC Zelllinien. Nach Inkubation wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen die Zellzahl bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachzählungen  $\pm$  SEM (System Error of the mean). Die Dosen sind in  $\mu$ M angegeben.

Besonders sensibel war die Zelllinie SK-Hep1 mit einer Wachstumshemmung bis 98% bei 2.0µM 2-ME. Die Kontrollgruppen, die entweder nicht oder mit dem nicht aktiven Metaboliten 16-Epiestriol behandelt wurden, zeigten keinerlei Wachstumshemmung. In diesen Gruppen wurde eine exponentielle Wachstumskurve beobachtet. Die mit 2-ME behandelten Zellen hingegen zeigten eine dosisabhängige Wachstumshemmung mit einer Hemmung von über 90% nach Behandlung mit 2µM 2-ME. Während der Proliferationsversuche untersuchten wir jeweils vor den Zählungen die Petrischalen auf Kontamination, Zellzahl und –morphologie unter dem Phasenkontrastmikroskop. Dabei fiel auf, daß die mit 2-ME behandelten Zellen deutliche Veränderungen in der Zahl und Morphologie erfuhren. Beispielhaft sind in Abbildung 4 representative Fotos von SK-Hep 1 Zellen, die während der Versuche angefertigt wurden. In Abbildung 4A und 4B erkennt man vitale Zellen, die weitgehend adhärent sind und eine geordnete morphologische Struktur aufweisen. Die Zellzahl scheint orientierend in diesen beiden Gruppen ähnlich zu sein. In Abbildung 4C hingegen zeigen sich massive Veränderungen. Die Zellen sind zu Gruppen zusammengeschrumpft, und es sind größere zellfreie Areale zu erkennen, was auf eine geringere Zellzahl hindeutet. Die Morphologie hat sich im Sinne des apoptotischen Zelltodes mit Kernfragmentierungen und Zellschrumpfung verändert. Die anderen drei Zelllinien verhalten sich analog.

## SK-Hep1

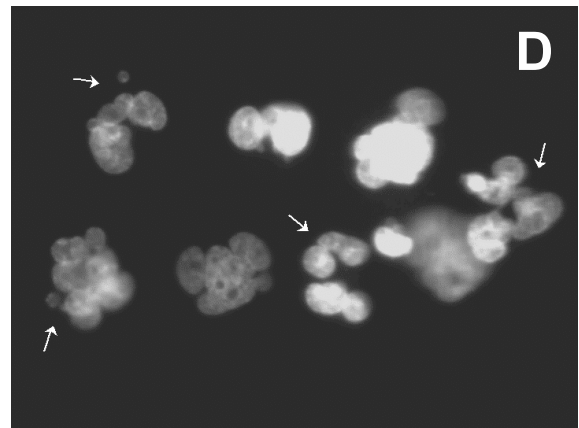
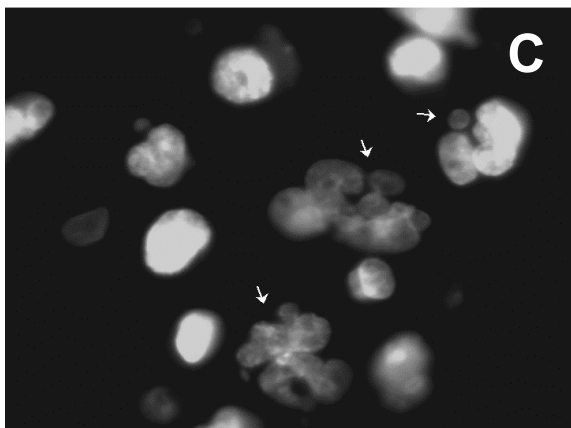
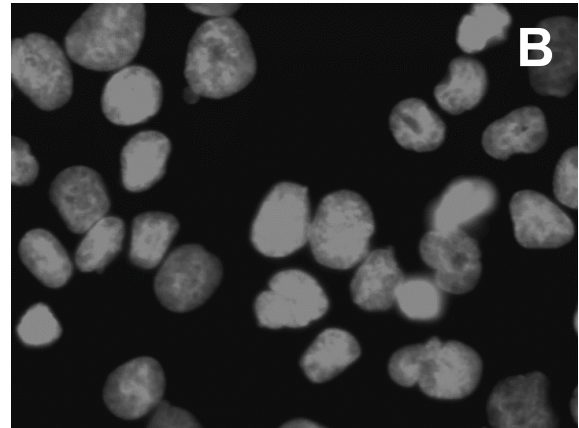
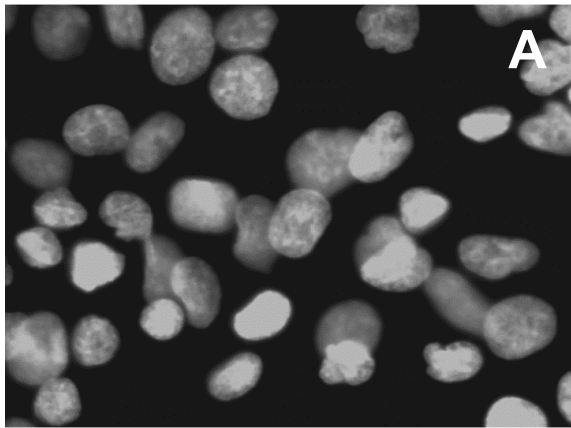


*Abbildung 4*

Phasenkontrastaufnahmen der SK-Hep1 Zelllinie nach 3-tägiger Behandlung mit A: PBS, B: MEC 1.5μM und C: 2-ME 1.5μM. Belichtungszeit: 1sec, Vergrößerung: 384-fach. Die Pfeile markieren typische apoptotische Zellen (4C).

### 4.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Kernmorphologie

Um die Kerne morphologisch besser differenzieren zu können, führten wir eine Kernfärbung durch, die im Fluoreszenzmikroskop deutlich wird (Abbildung 5-8).

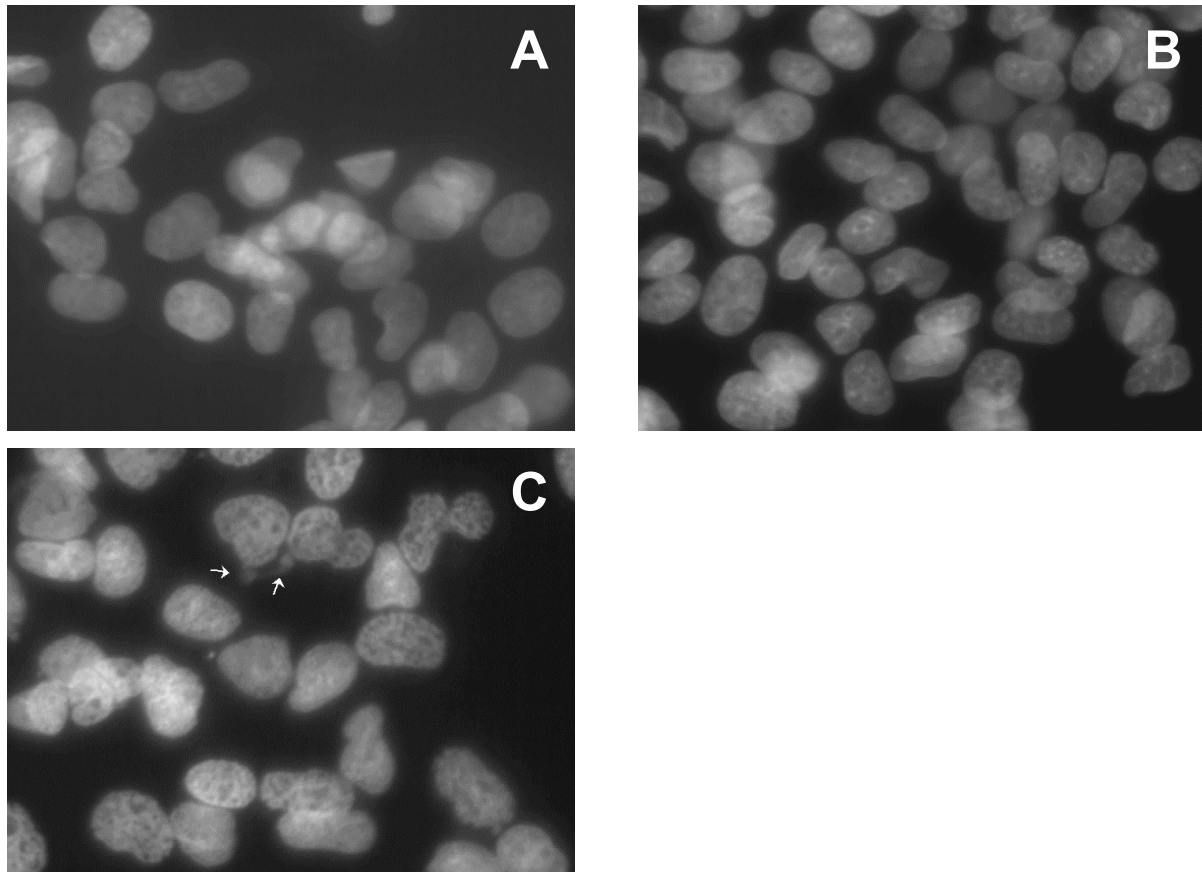


**Abbildung 5**

Fluoreszenzfärbung (Hoechst) der SK-Hep1 Zellen nach Behandlung mit A: PBS, B: MEC 2.0μM, C: 1.5μM 2-ME und D: 4.0μM 2-ME. Behandlungsdauer: 3 Tage. Vergrößerung; 384 fach. Unterschiede zu der regulären Kernstruktur, die auf Apoptose hinweisen, sind durch weiße Pfeile markiert.

Unter dem Mikroskop zeigten sich bei den Kernen der Kontrollgruppe und der mit MEC behandelten Gruppe nach Anfärbung gleichmäßig intensiv leuchtende Zellkerne, wobei es sich um morphologisch reguläre Zellkerne in Monolayer handelte (Abbildung 5A und 5B). Auch hier waren die Zellen vital, adhären und gleichmäßig verteilt. Die spontane Apoptoserate betrug hier etwa 5%. Nach Gabe von 2-ME verminderte sich die Anzahl der Zellen deutlich und es wurden charakteristische Apoptosezeichen sichtbar (Abbildung 5C und 5D). Es trat Zellschrumpfung durch Zytoplasmaabnahme ein. Besonders bei einer Dosis von 4μM 2-ME wurde gehäufte nukleäre Fragmentation mit Chromatinkondensation und „Membranblebbing“, hauptsächlich in den zu Zellclustern zusammengelagerten Zellen, beobachtet.

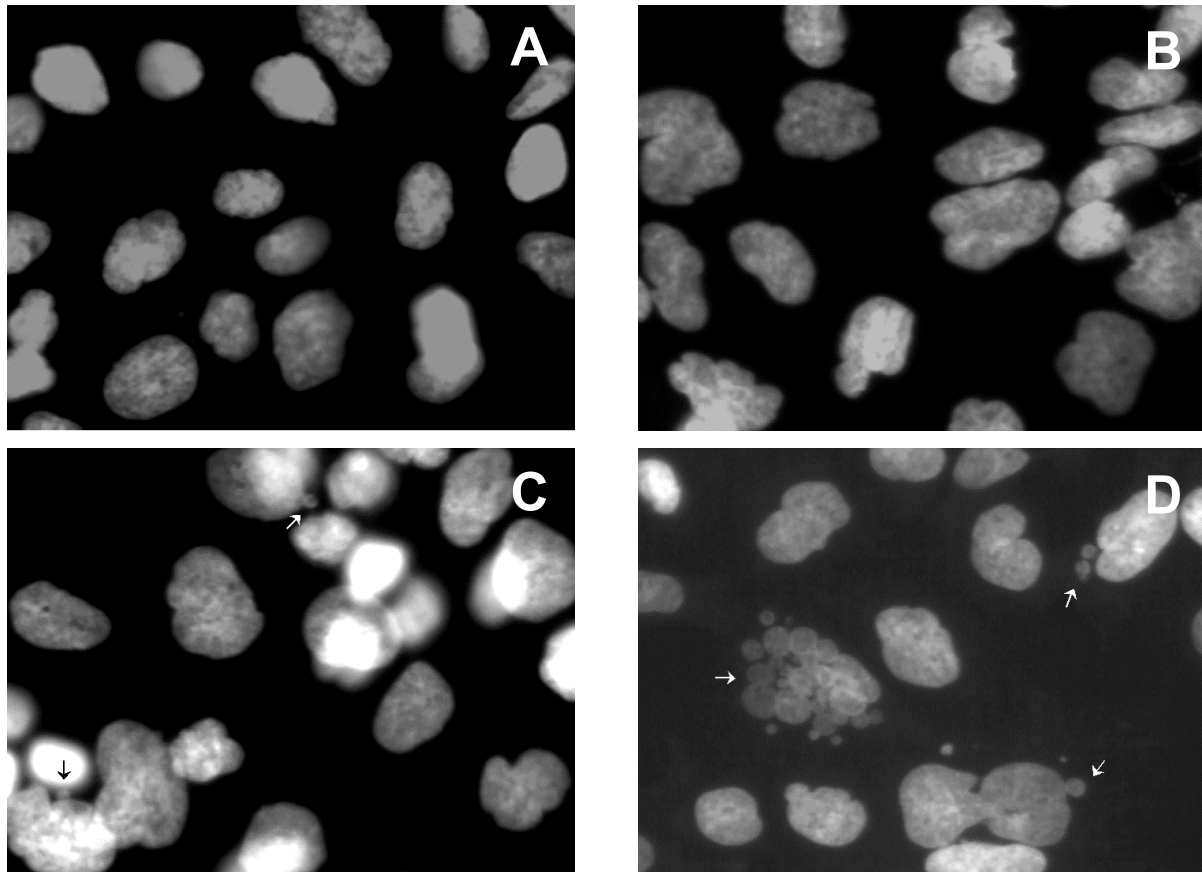




*Abbildung 6*

Fluoreszenzfärbung (Hoechst) der HepG2 Zellen nach Behandlung mit A: PBS, B: MEC 5.0μM und C: 5.0μM 2-ME. Behandlungsdauer: 3 Tage. Vergrößerung; 384 fach. Unterschiede zu der regulären Kernstruktur, die auf Apoptose hinweisen, sind durch weiße Pfeile markiert.

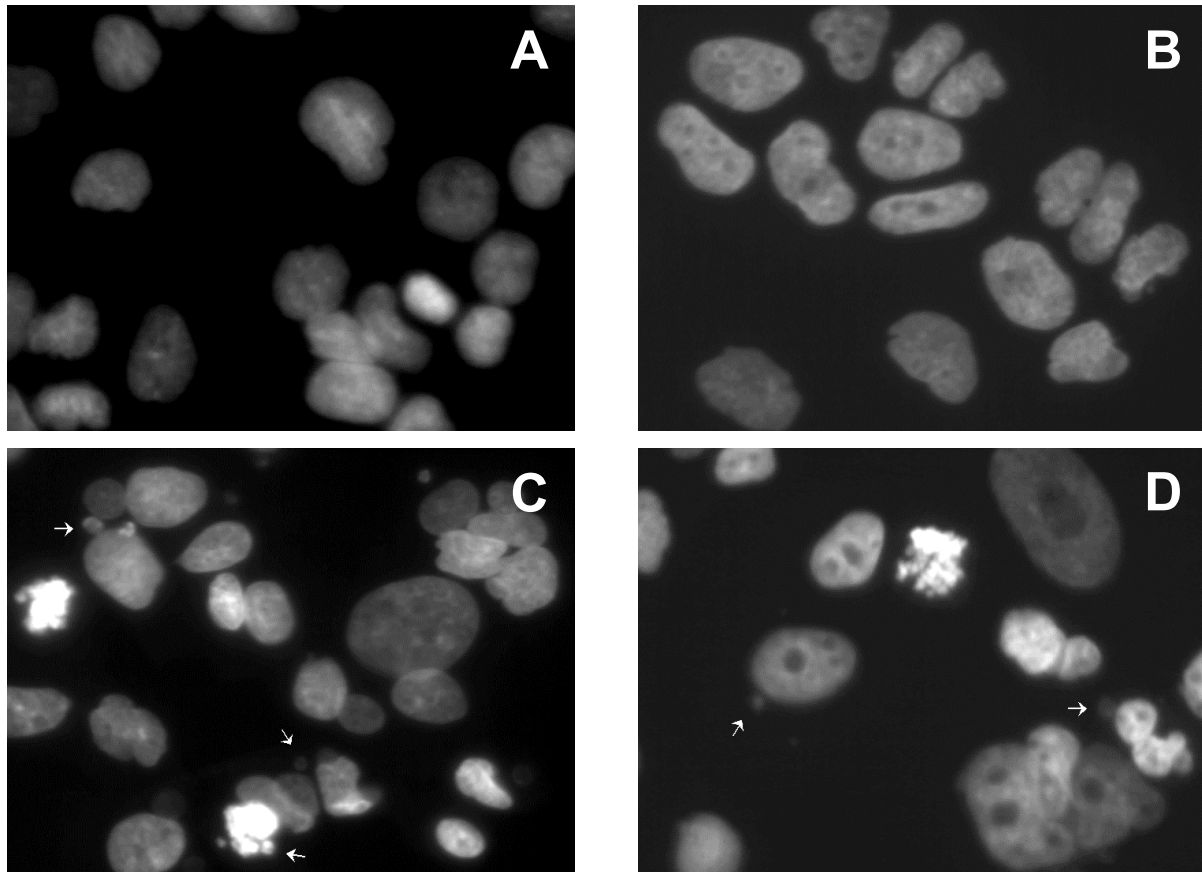
Die in Abbildung 6 dargestellten Hep G2-Zellen zeigten auch nach 2-ME Gabe in der hohen Dosis von 5.0μM nur diskrete Abweichungen von der regulären Kernstruktur in Form von Kernfragmentationen (Abbildung 6C). Die Apoptoserate stieg auf nur ca. 2% an. Wie auch bei den SK-Hep 1 Zellen wirken die nicht und die mit 16-Epiestriol behandelten Zellen adhärent, vital und gleichmäßig verteilt.



*Abbildung 7*

Fluoreszenzfärbung (Hoechst) der Hep 3B Zellen nach Behandlung mit A: PBS, B: MEC 4.0  $\mu$ M, C: 2.0  $\mu$ M 2-ME und D: 4.0  $\mu$ M 2-ME. Behandlungsdauer: 3 Tage. Vergrößerung; 384 fach. Unterschiede zu der regulären Kernstruktur, die auf Apoptose hinweisen, sind durch weiße Pfeile markiert.

Bei der Zelllinie Hep 3B wurden ebenfalls in den beiden Vergleichsgruppen farbintensive reguläre Zellkerne in Monolayern gefunden. Wiederum sind die Zellen vital, adhärent und gleichmäßig verteilt. Die spontane Apoptoserate lag hier bei etwa 0,5 % (Abbildung 7A und 7B). Hingegen zeigte sich nach Behandlung mit 2-ME ein Anstieg der Apoptoserate auf 2,5% bei einer Dosis von 2.0  $\mu$ M und auf 5% bei 4.0  $\mu$ M 2-Me (Abbildung 7C und 7D). Zugleich wurden entsprechende apoptotische Veränderungen der Zellen vor allem bei höheren Dosen 2-Methoxyestradiol gefunden.



**Abbildung 8**

Fluoreszenzfärbung (Hoechst) der PLC/PRF/5 Zellen nach Behandlung mit A: PBS, B: MEC 3.0µM, C: 3.0µM 2-ME und D: 4.0µM 2-ME. Behandlungsdauer: 3 Tage. Vergrößerung; 384 fach. Unterschiede zu der regulären Kernstruktur, die auf Apoptose hinweisen, sind durch weiße Pfeile markiert.

Die Kontrollgruppen A und B in Abbildung 8 zeigten wie bei den andern Zelllinien vitale Zellen mit normaler Kernmorphologie. Nach Behandlung mit 2-ME kam es erneut zur Zunahme der apoptotisch veränderten und teilweise geschrumpften Zellen. Bei einer Dosis von 3µM 2-ME zeigte sich eine beginnende Kernfragmentation mit Chromatinkondensation und ein Anstieg der Apoptoserate auf 2%, die bei einer Dosis von 4.0µM 2-ME auf 9.5% gesteigert wurde (Abbildung 8C und 8D).

Bei der Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop zur Differenzierung zwischen normalen und apoptotischen Zellen konnte in den mit 2-ME behandelten Gruppen der Anstieg der apoptotischen Zellen beobachtet werden. SK-Hep 1 zeigt eine maximale Apoptoserate von 10% bei 1,5µM 2-ME. Das ist deutlich weniger, als nach den Erfahrungen der vorhergehenden Untersuchungen erwartet. Größtenteils ist

diese Diskrepanz methodenbedingt, da in der Zubereitung und Färbung der Zellen Schritte mit Waschungen eingeführt wurden, die zum Verlust der teilweise gelösten apoptotischen Zellen führten.

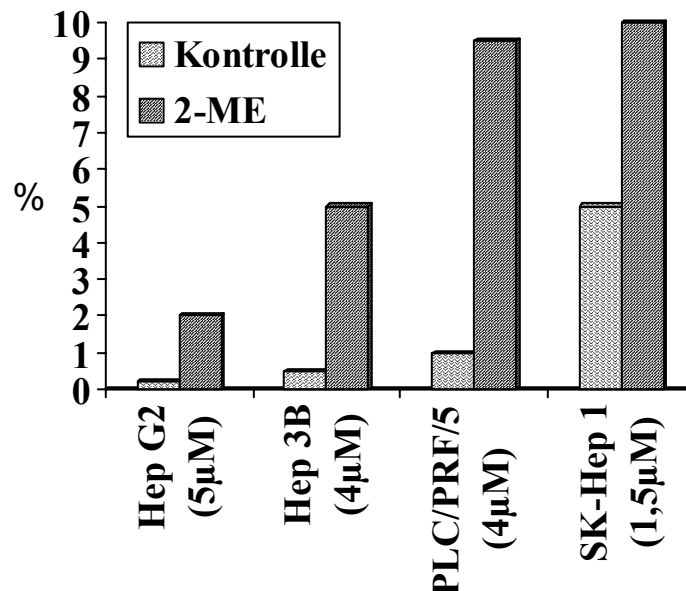


Abbildung 9

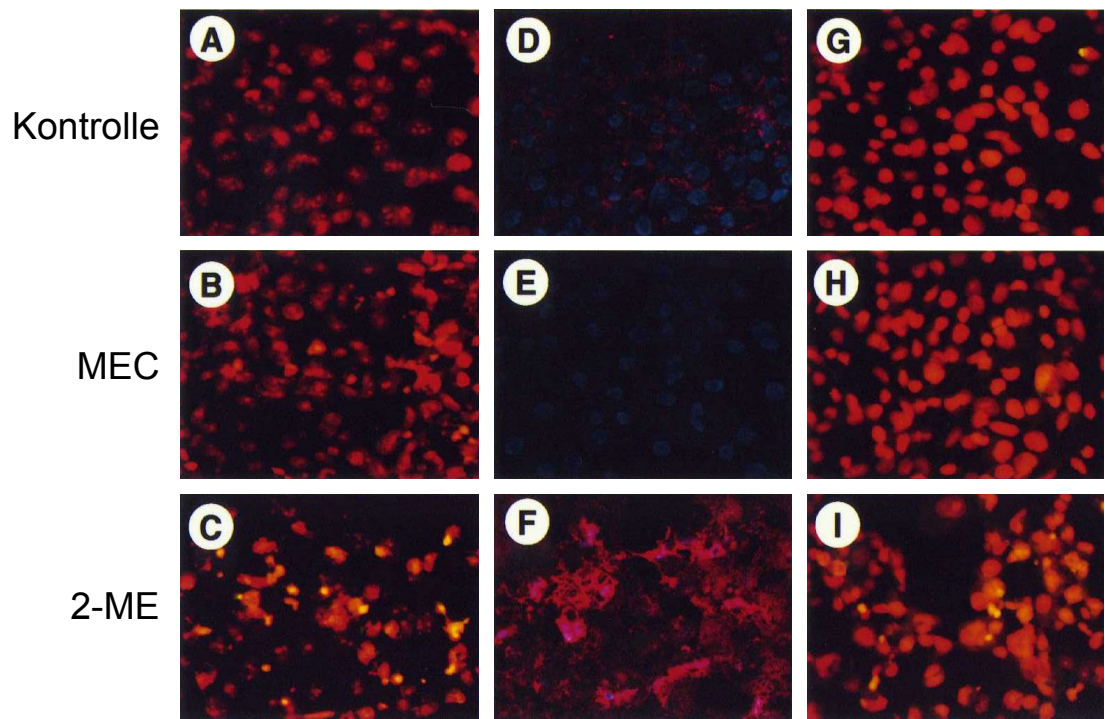
Prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen aller vier Zelllinien in den mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Zellkulturen. Die Zellzählung erfolgte geblindet durch zwei unabhängige Untersucher. Es wurden mindestens 500 Zellen pro Behandlungsgruppe ausgezählt. Die Dosierungen unter den Namen der Zelllinien entsprechen den Dosen 2-ME.

#### 4.1.3. Immunzytologischer Apoptosenachweis

Um einen immunzytologischen Nachweis der Induktion von Apoptose erbringen zu können, färbten wir die Kulturen nach Behandlung mit 2-ME, MEC oder PBS auf Apo 2.7, Annexin V und TUNEL. Alle drei Färbemethoden können apoptotischen Zelltod nachweisen. Als Kontrolle verwendeten wir humane Hepatozytenkulturen, die aus Leberresektaten gewonnen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben. Man erkennt das Vorliegen von apoptotischen Zellen nach Behandlung mit 2-ME in allen vier Zelllinien mit allen drei Färbemethoden. Kein Nachweis apoptotischer Zellen gelang in den Kontrollgruppen der mit PBS oder MEC behandelten Zellen. Ebenso verhielten sich die humanen Hepatozyten, bei denen auch in den mit 2-ME behandelten Gruppen kein Zuwachs der Apoptoserate zu erkennen war. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis. Kontrollzellen und Zellen, die mit MEC inkubiert wurden,

zeigten keinerlei Unterschiede im Anfärbeverhalten. Sehr geringe bis keine spezifisch gefärbte Zellen auf Apoptose sind erkennbar. Auch hier sieht man wiederum eine sehr gleichmäßige Verteilung der adhärenenten und vitalen Zellen. Die Zellen, die mit 2-ME behandelt wurden, zeigten deutliche spezifische Färbungen für Apoptose bei allen Tumorzelllinien (Abbildung 10.1. C, F, I; 10.2. C, F, I; 10.3. C, F, I; 10.4. C, F, I;). Der apoptotische Zelltod wurde also allein durch 2-ME ausgelöst. Am stärksten färbten sich die SK-Hep1 und die Hep 3B Zellen an, die auch in den Fluoreszenzuntersuchungen den höchsten Anteil apoptotischer Zellen besaßen. Etwas weniger Färbung zeigten Hep G2 und PLC/PRF/5 Zellen, was ebenfalls unsere Auszählungen der mit Hoechst gefärbten Zellen bestätigt. Normale Hepatozyten zeigten in allen drei Behandlungsgruppen eine geringe Färbung für Apoptose. Normale Hepatozyten werden demnach durch 2-ME nicht geschädigt, ein Unterschied der Färbeintensität war zwischen Kontrollgruppe, MEC-Gruppe und 2-ME-Gruppe nicht feststellbar. Auch die Kriterien Zellzahl, Verteilungsmuster und Zellvitalität war in allen drei Gruppen gleich.

## 10.1. SK-Hep 1



## 10.2. Hep G2

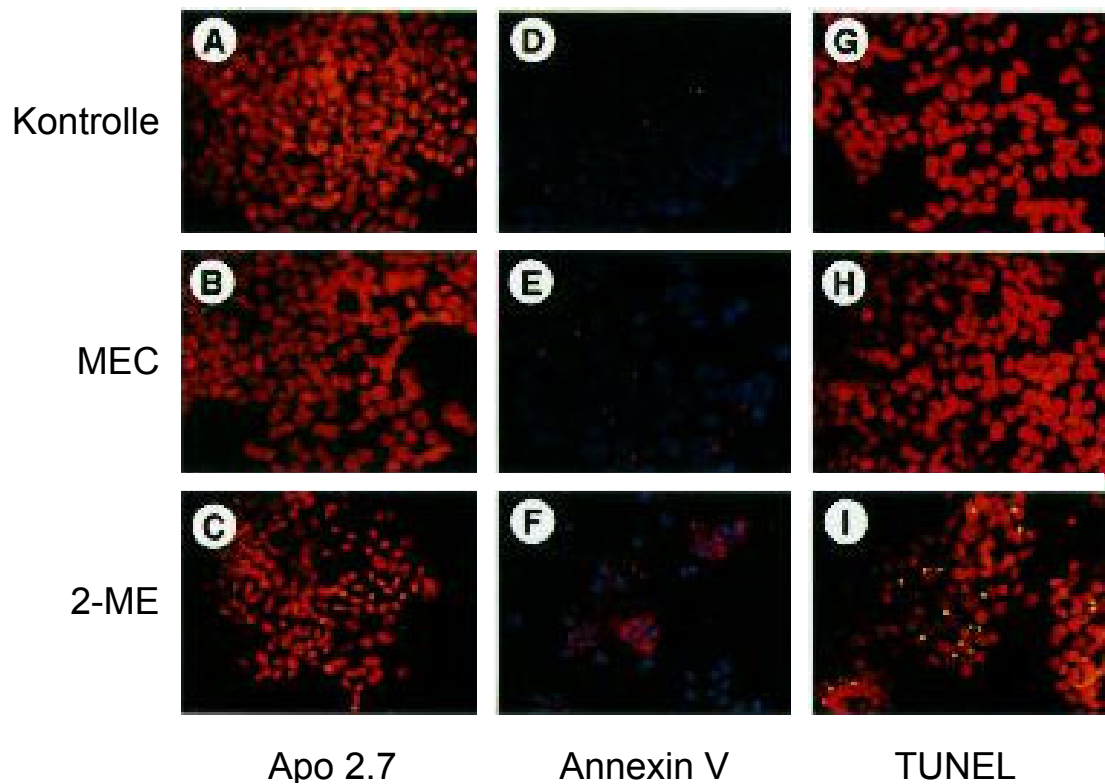
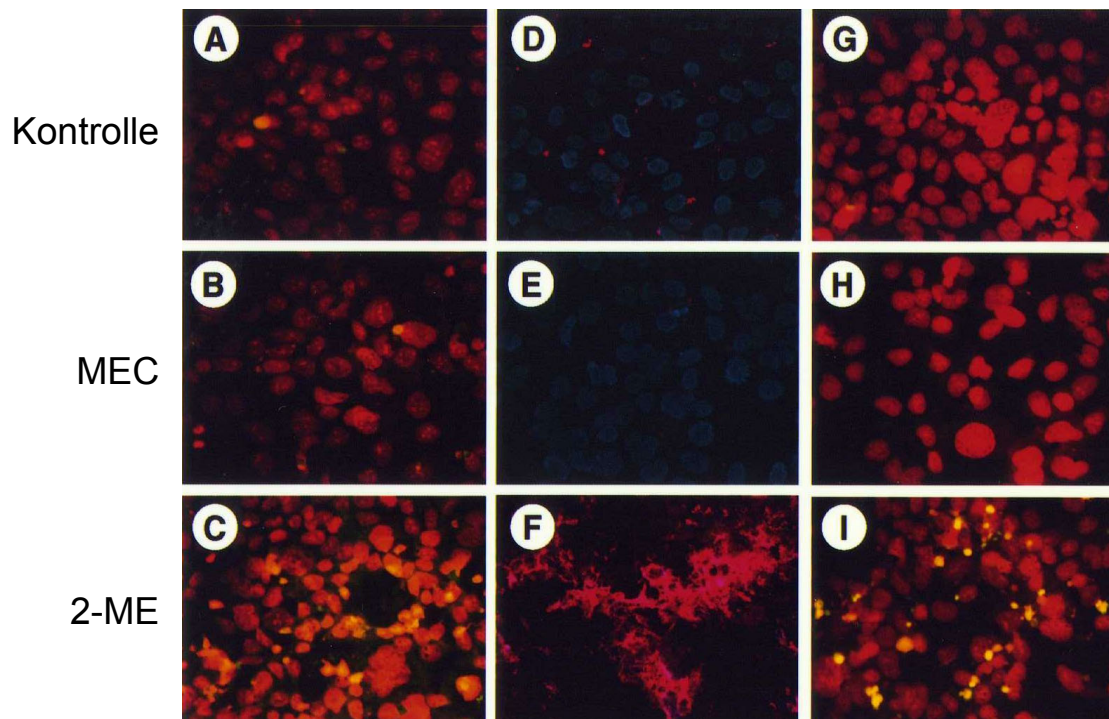


Abbildung 10.1. /10.2



### 10.3. Hep 3B



### 10.4. PLC/PRF/5

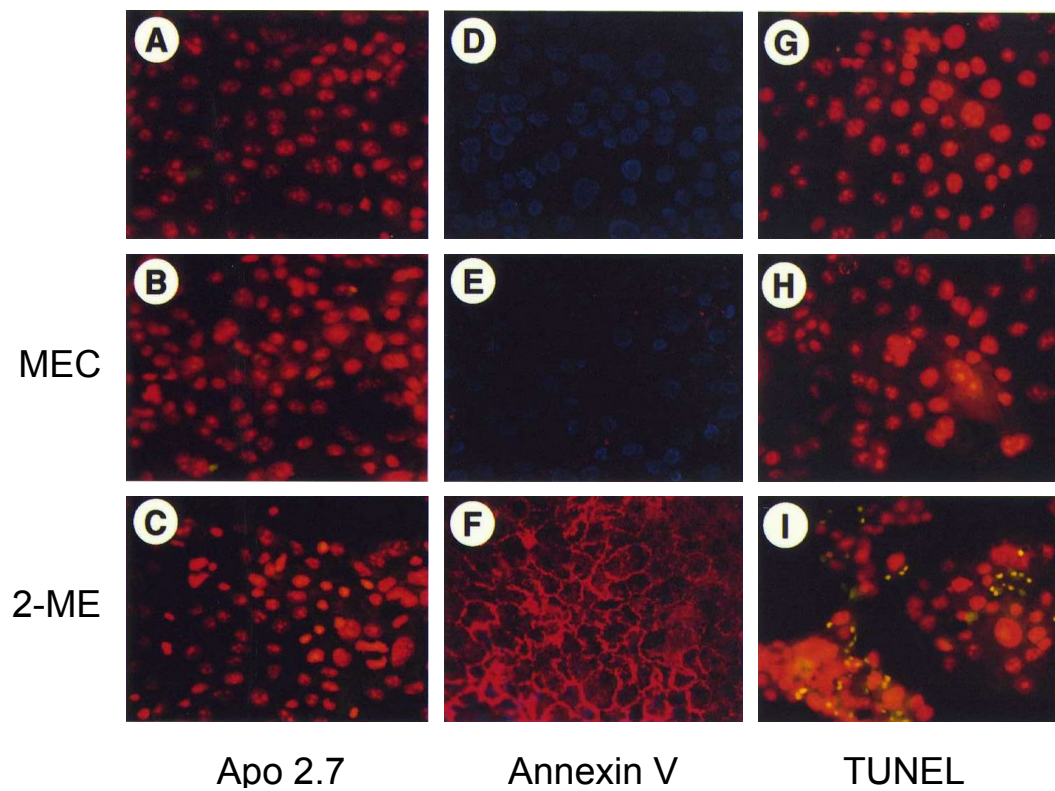


Abbildung 10.3. / 10.4.

## 10.5. Hepatozyten

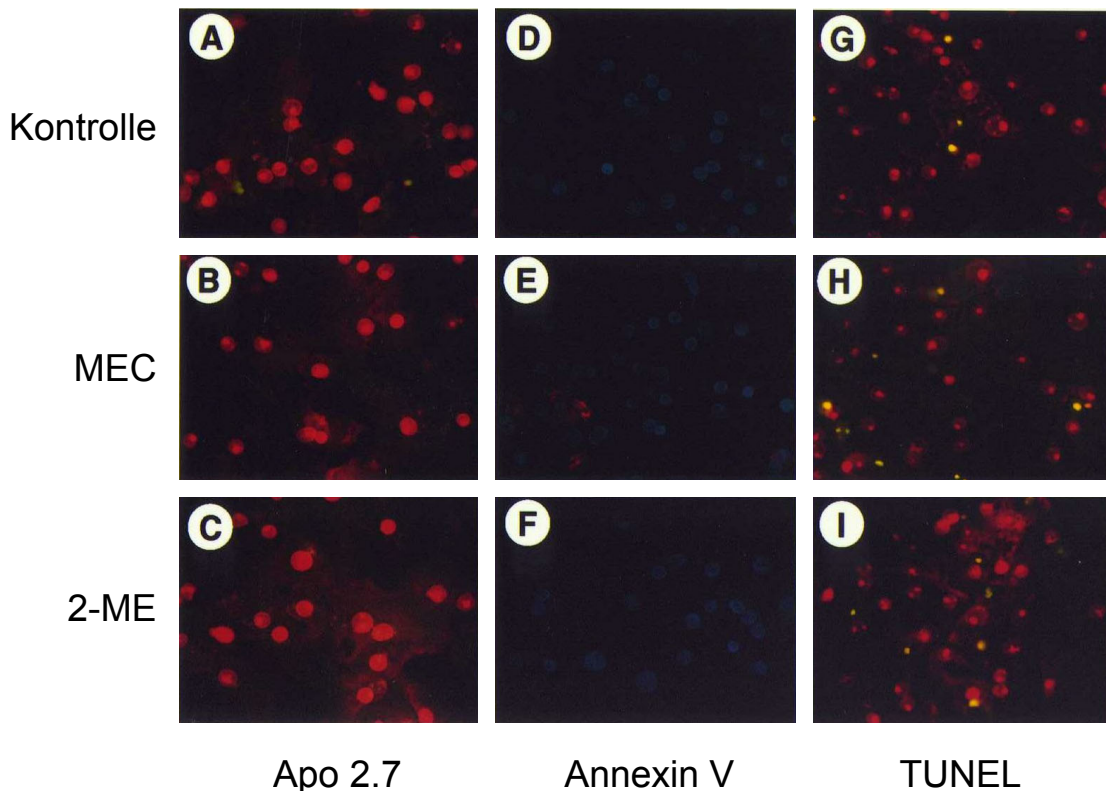


Abbildung 10.5

Abbildung 10.1.-10.5.

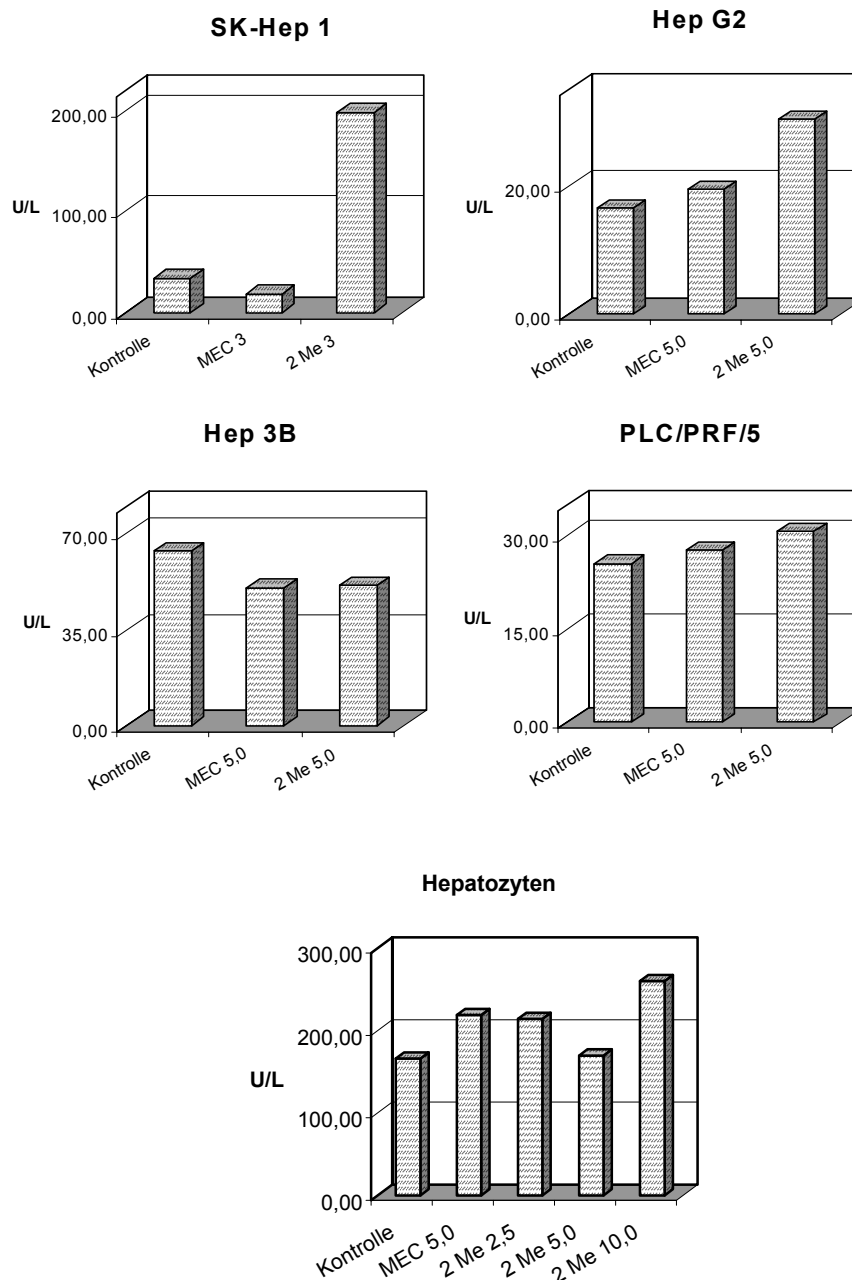
Spezifische immunzytologische Färbungen zum Nachweis apoptotischer Zellen. Die verwendeten Dosen von 2-ME oder MEC betrugen für Sk-Hep 1 3,0µM und für Hep G2, Hep 3B, PLC/PRF/5 und den frischen humanen Hepatozyten 5,0µM. Der Behandlungszeitraum betrug 2 Tage. Die Färbung erfolgte für Apo 2.7 (A-C), Annexin V (D-F), oder TUNEL (G-I). Kontrolle mit PBS A, D, G, mit MEC B, E, H. Bei Vorliegen von Apoptose war eine spezifische Färbung vorhanden: Gelbe Punkte bei Apo 2.7 (C), rote Färbung bei Annexin V (F) und gelbe Punkte in der TUNEL Färbung (I).

Aus den Untersuchungen zur Wirkung von 2-ME auf das Wachstumsverhalten von Tumorzelllinien ergab sich, daß 2-ME bei 4 getesteten HCC-Zelllinien signifikant zu einer Wachstumshemmung durch Induktion von Apoptose führt. Kein Unterschied der Farbeintensität ist zwischen Kontrollgruppe, mit MEC oder mit 2-ME behandelten Gruppen der Hepatozyten erkennbar. Auch die Anzahl, das Verteilungsmuster und die Vitalität der Zellen ist offensichtlich in allen Gruppen gleich. Somit kommt es bei normalen Hepatozyten zu keinem Zuwachs der apoptotischen Zellen durch 2-ME.



#### 4.1.4. Messung der Zellschädigung mittels AST-Konzentrationen

Durch Messung der AST-Konzentration im zellfreien Mediumüberstand aller Behandlungsgruppen sowie gesunder humaner Hepatozyten versuchten wir, indirekt Rückschlüsse über eine mögliche Zellschädigung (Freisetzung intrazellulärer Enzyme in das Medium) nach Behandlung mit 2-Methoxyestradiol zu ziehen (Abbildung 11).



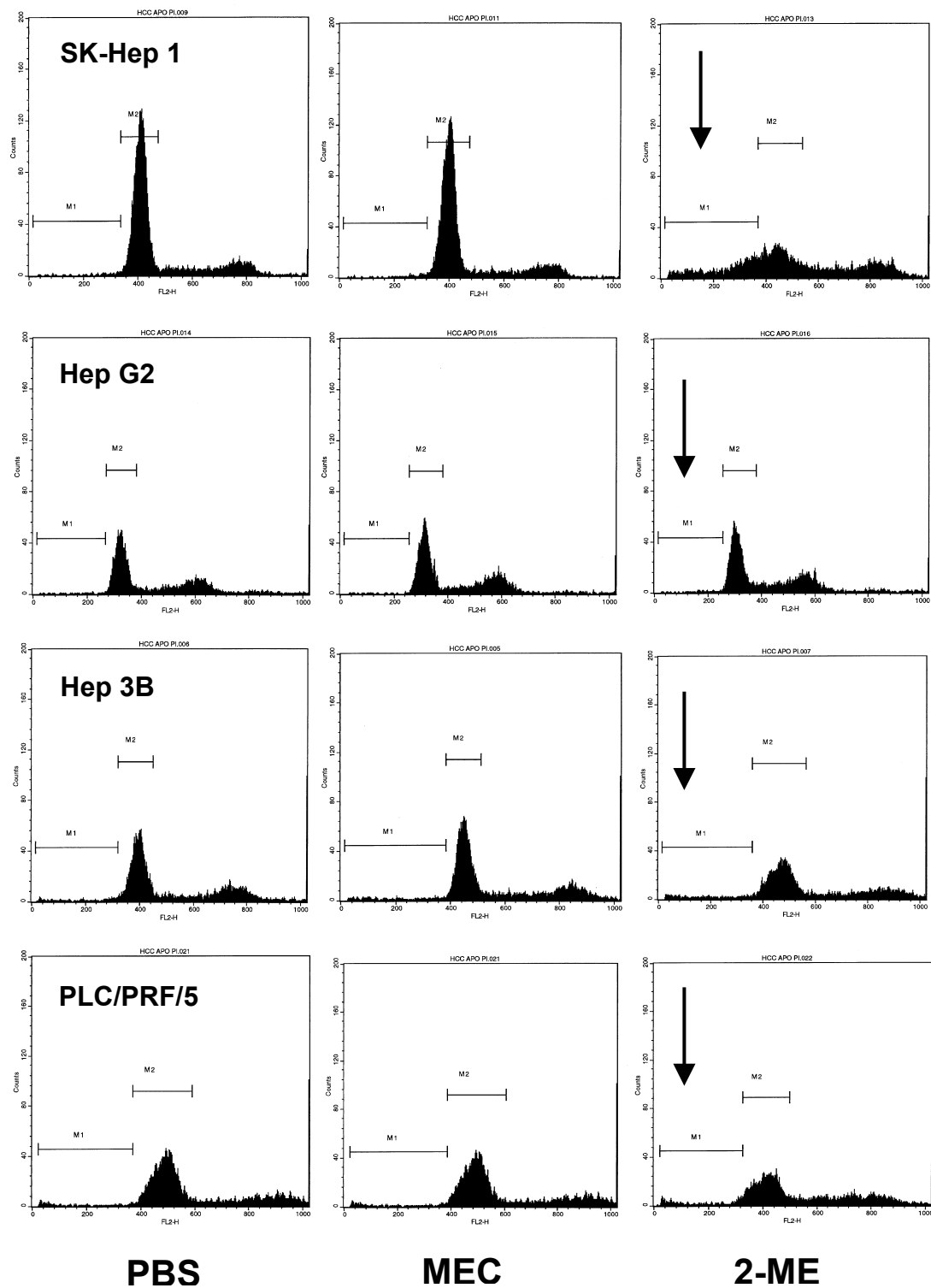
**Abbildung 11**

Messung der AST-Gehalte im Überstand aus den Zellkulturen nach Behandlung mit PBS, MEC und 2-ME.

Es ergab sich, daß die mit 2-ME behandelten SK-Hep 1 und Hep G2 Zellen einen deutlichen Anstieg der AST Werte im Gegensatz zu den mit PBS oder MEC behandelten Zellen zeigten (Abbildung 11). Die normalen Hepatozyten reagierten jedoch nicht mit einem Anstieg der AST-Werte nach Behandlung mit 2-ME, was zu erwarten war. Die Hep 3B und PLC/PRF/5 Zellen, die eine deutliche Wachstumshemmung durch Apoptose nach 2-ME erlitten, zeigten ebenfalls keinen Anstieg der AST Werte in allen Behandlungsgruppen wie bei den normalen Hepatozyten. Nach diesen Befunden scheint diese Methode als Parameter für die Einschätzung der Zellschädigung ungeeignet.

#### 4.1.5. Zellzyklusanalysen

Zur weiteren Untersuchung des Mechanismus der Wachstumshemmung von Tumorzellen durch Behandlung mit 2-ME, führten wir Analysen im Durchflußzytometer durch. Dieses Verfahren erlaubt die quantitative Bestimmung von Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen sowie apoptotischer Zellen in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Die Zellzyklusanalyse wurde am 2. und 3. Tag nach Behandlung durchgeführt. Man erkennt eine normale Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen in den mit PBS und MEC behandelten Gruppen mit der größten Fraktion der Zellen in der G1-Phase. Es schließt sich die S-Phase, die Synthesephase an und endet mit der G2/M-Phase, in der sich die Zellen teilen. Bei allen vier Zelllinien zeigte sich eine Zunahme der Apoptose-Induktion bei den mit 2-ME behandelten Zellen am dritten Behandlungstag, was durch eine Zunahme der Zellen in der Sub-G1 Region gekennzeichnet ist. Hier befinden sich Zellen mit geringem DNA-Inhalt, was kleinfragmentierter DNA entspricht. Dies ist ein typisches Zeichen für Apoptose. Hep G2 Zellen hatten einen geringeren Anteil der Zellen in der Sub-G1 Region, und somit waren weniger apoptotische Zellen vorhanden.



**Abbildung 12**

Zellzyklusanalysen zur Bestimmung der einzelnen Zellzyklusphasen in Abhängigkeit der Behandlungsgruppen. Die Behandlungsdosen mit MEC oder 2-ME waren  $1,5\mu\text{M}$  bei SK-Hep 1 Zellen,  $2,5\mu\text{M}$  bei Hep G2, Hep 3B und PLC/PRF/5 Zellen für 3 Tage. Die Pfeile markieren die Sub-G1 Region, deren Zellgehalt durch apoptotische Zellen gebildet wird.

Tabelle 4 zeigt die Verteilung der Zellen in der Sub-G1-Phase und der G1-Phase nach Behandlung mit PBS oder 2-ME. Man sieht einen deutlichen Zuwachs der Zellen in der Sub-G1-Phase bei den SK-Hep 1, Hep 3B und PLC/PRF/5 Zellen bei gleichzeitiger Verringerung der Zellen in der G1-Phase. Weniger deutlich ist der Unterschied bei der Hep G2 Zelllinie, die eine sehr geringe Apoptoserate nach Behandlung mit 2-ME aufweist.

Zelllinie	Behandlung	Sub-G1 in %	Signifikanz	G1 in %
Sk-Hep 1	Kontrolle	0,73	P < 0,0001	61,92
	1,5µM 2-Me	17,76		25,11
Hep G2	Kontrolle	0,36	P < 0,8	21,33
	2,5µM 2-Me	0,64		23,75
Hep 3B	Kontrolle	1,66	P < 0,005	29,13
	2,5µM 2-Me	4,7		30,47
PLC/PRF/5	Kontrolle	1,62	P < 0,001	38,29
	2,5µM 2-Me	10,39		19,42

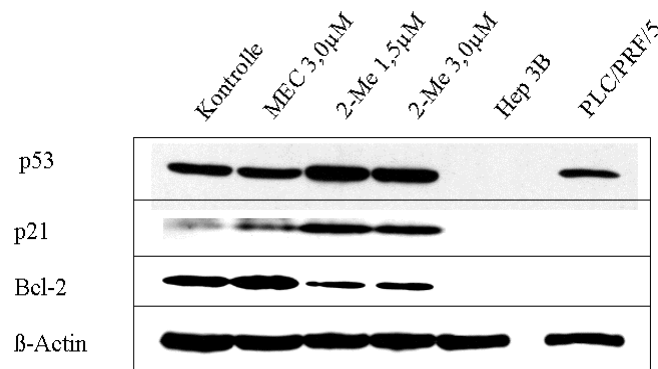
*Tabelle 4*

Prozentualer Anteil der Zellen in Sub-G1- bzw G1-Phase nach Behandlung mit PBS oder 2-ME.

Bei allen Zelllinien kam es nach Behandlung mit 2-ME zu einem teilweise stark erhöhten Anteil an Zellen in der Sub-G<sub>1</sub>-Region bei verringerter G<sub>1</sub>-Fraktion. 2-ME induziert also Apoptose. In den Kontrollgruppen wurde keine über die spontane Rate hinausgehende Apoptose gefunden. Ein Arrest in der G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>-Phase als weiterer Mechanismus der Proliferationshemmung nach 2-Me-Gabe wurde nicht beobachtet.

#### 4.1.6. Molekulare Veränderungen nach 2-ME-Gabe

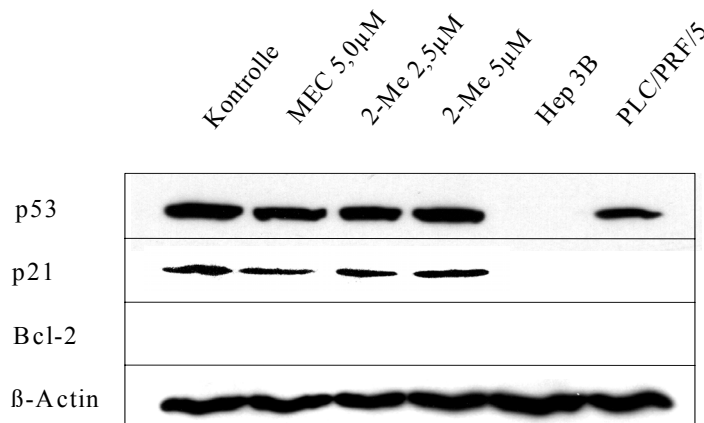
Mittels Western Blot Analysen wurden verschiedene apoptosebezogene Proteine untersucht. Dabei zeigten sich deutliche molekulare Unterschiede bei den mit 2-ME behandelten Zellen. Als Negativkontrolle für das Protein p53 dienten Hep 3B-Zellen, die eine Deletion und damit kein detektierbares p53-Protein aufweisen. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie PLC/PRF/5 benutzt, die ein mutiertes p53-Gen besitzt, was eine massive Überexpression eines nicht funktionsfähigen p53 Proteins zur Folge hat. Nach Gabe von 2-ME wurde bei der Wild-Typ p53 exprimierenden Zelllinie SK-Hep 1 eine starke Hochregulation des p53 Proteins um das 4-fache gefunden. Um die Funktionalität des hochregulierten p53 Proteins einschätzen zu können, untersuchten wir die Expression des p21 Proteins, einem direkten Effektorprotein des p53, im Zusammenhang mit der Hochregulation des p53 Proteins. p21 wurde nach Behandlung mit 2-ME um das 6-fache heraufreguliert. Dieser Befund erhärtet die These, daß 2-ME funktionell aktives p53 Protein hochreguliert, was die These des funktionell aktiven p53 Proteins nach 2-ME erhärtet. Auch bcl-2 als das stärkste bekannte Antiapoptoseprotein wurde auf seine Expression nach Behandlung mit 2-ME untersucht. In der 2-ME Gruppe wurde deutlich, daß bcl-2 um das 9-fache niedriger exprimiert ist, was durch eine densitometrische Analyse gemessen wurde. Abbildung 13 zeigt diese Expressionsmuster.



**Abbildung 13**

Western Blot Analyse der SK-Hep 1 Zelllinie. Die geladene Proteinmenge betrug für p53 50µg, für p21 und bcl-2 100µg und für β-Actin 10µg pro Bande.

Bei den Hep G2 Zellen, die ebenfalls Wild-Typ p53 exprimieren, konnten wir p53 und p21 nachweisen (Abbildung 14). p53 wurde ebenfalls heraufreguliert, jedoch in einem geringeren Ausmaß als in SK-Hep 1 Zellen. p21 zeigte keine vermehrte Expression nach Behandlung mit 2-ME. Bcl-2 konnte nicht nachgewiesen werden. Die Hep 3B Zellen besitzen eine Deletion für das p53 Gen und exprimieren kein p53 Protein. Die PLC/PRF/5 Zellen sind mutiert für das p53 Gen und exprimieren viel funktionell inaktives p53 Protein. Somit ergaben die gemessenen apoptosebezogenen Proteine in den beiden zuletzt genannten Zelllinien keine zusätzlichen Ergebnisse und sind daher nicht dargestellt.



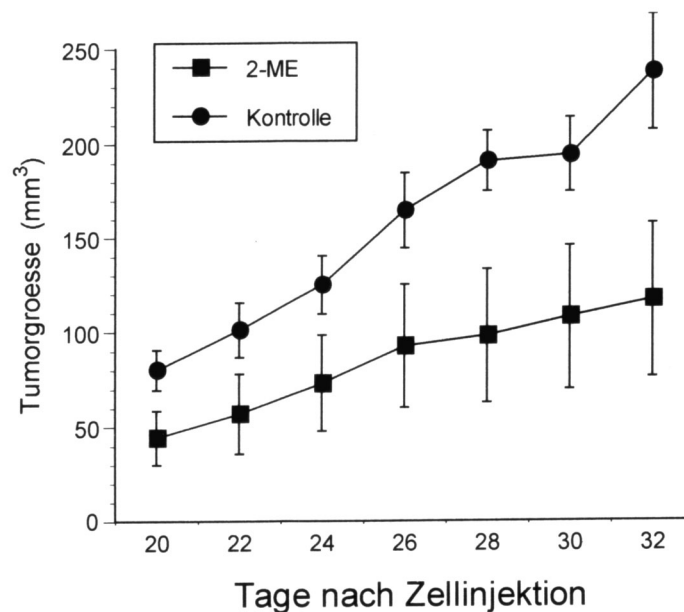
**Abbildung 14**

Western Blot Analyse der Hep G2 Zelllinie. Die geladene Proteinmenge betrug für p53 50μg, für p21 und bcl-2 100μg und für β-Actin 10μg pro Bande.

Die Western-Blot Analysen zeigten somit, daß 2-ME funktionell aktives p53 Protein hochregulieren kann. Die Bedeutung davon ist, daß Induktion von Apoptose bei Wild-Typ p53 exprimierenden Zellen, zumindest zum Teil, p53 abhängig ist. Dies gilt auch, wenn auch in geringerem Ausmaß, für die Hep G2 Zellen, die ebenfalls Wild-Typ p53 exprimieren. Da bei SK-Hep1 Zellen gleichzeitig das Antiapoptoseprotein bcl-2 herunterreguliert wird, wird die Induktion der Apoptose durch 2-ME dadurch weiter gefördert. Diese beiden Beobachtungen erklären vermutlich die besondere Sensibilität der SK-Hep1 Zellen auf 2-ME.

#### 4.1.7. Wirksamkeit von 2-ME in vivo

Als Tiermodell dienten athymische weibliche Nacktmäuse wie in Material und Methoden beschrieben. Nach Beendigung der Versuche trugen wir das durchschnittliche Tumolvolumen der beiden Behandlungsgruppen in einer Graphik zusammen (Abbildung 15). In der mit 2-ME behandelten Gruppe wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Wachstumshemmung der Tumoren um 55% beobachtet.

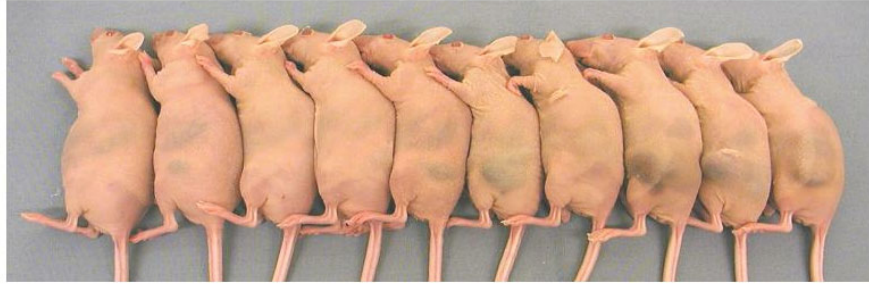


**Abbildung 15**

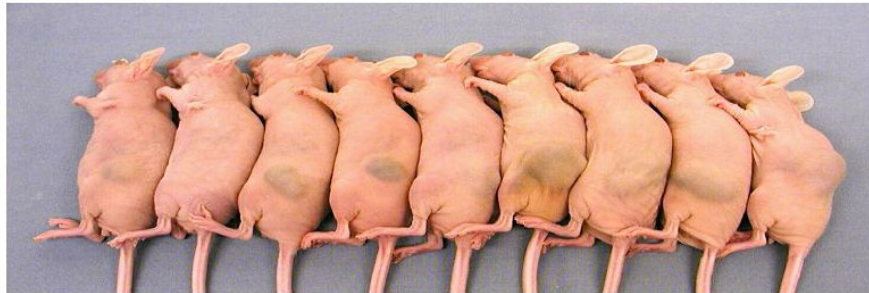
In vivo Versuch mit subcutanen Tumoren nach Injektion von Hep 3B Zellen bei weiblichen athymischen Nacktmäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (System error of the mean).

Die Wachstumshemmung ist im Students *t*-Test mit  $p < 0.04$  signifikant. Zwei der Tiere aus der mit 2-ME behandelten Gruppe waren komplett tumorfrei. Augenscheinliche Toxizität wie Gewichtsverlust, Verweigerung der Nahrungsaufnahme oder Verhaltensveränderungen wurden nicht beobachtet. Dieses unveränderte Verhalten war in beiden Gruppen gleich. Alle Tiere aus diesem Versuch sind unmittelbar vor der Tötung in Abbildung 16 aufgereiht. Die Mäuse sind nach der Größe der Tumoren innerhalb der Behandlungsgruppe, links mit dem kleinsten beginnend, sortiert. So kann man im direkten Vergleich die Tumorgößen abschätzen.

2-ME



Kontrolle



*Abbildung 16*

Abbildung aller Tiere nach Beendigung des Tierversuches. Eine Maus aus der Kontrollgruppe war eine Woche nach Versuchsbeginn aus unklaren Gründen verstorben.



## 4.2. 2-ME zur Behandlung des Pankreaskarzinoms

### 4.2.1. p53 Mutationsstatus verschiedener Zelllinien

Da die Wirkung von 2-ME bei Tumorzellen p53 abhängig sein kann, verwendeten wir Zelllinien mit einer Mutation für das p53 Gen, um zu untersuchen, ob auch p53 unabhängige Mechanismen bei der Induktion der Apoptose von Bedeutung sind. Dazu wurde eine PCR und Sequenzierung der DNA durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tabelle 5 dargestellt. Alle vier verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien wiesen eine Mutation für das p53 Gen in unterschiedlichen Exonen auf. Untersucht wurden die Exone 5 – 8, da sich 90% der p53 Mutationen in diesen Exonen befinden. Die Zelllinien PaTu 8988t und PaTu 8988s stammen aus einem einzigen Tumor, so daß es sich um dieselbe Mutation handelt. Durch die Mutation des p53 Gens wird jeder beobachtete Effekt von 2-ME auf diese Tumorzellen eher p53 unabhängig sein.

Zelllinie	Exon	Codon	Basenaustausch	Aminosäure
PaTu 8902	5	176	T zu A	Cys zu Ser
PaTu 8988t	8	282	C zu T	Arg zu Trp
MIAPaCa-2	7	248	C zu T	Arg zu Trp
PaTu 8988s	8	282	C zu T	Arg zu Trp

*Tabelle 5*

p53 Status in 4 humanen Pankreaskarzinomzelllinien.

### 4.2.2. Wachstumshemmung durch 2-ME beim Pankreaskarzinom

Die vier humanen Pankreaskarzinomzelllinien PaTu 8902, PaTu 8988t, PaTu 8988s und MIAPaCa-2 wurden mit verschiedenen Dosen 2-ME und MEC inkubiert und nach 1, 3 und 5 Tagen gezählt. Abbildung 17 zeigt die Proliferation aller vier Zelllinien ohne Behandlung und mit verschiedenen Dosen 2-ME als Dauerbehandlung über 5 Tage. Dargestellt sind die prozentualen Zellzahlen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, die mit 100% angegeben ist. Die Proliferationsrate der mit 2-ME behandelten Zellen war dosisabhängig signifikant langsamer als die Kontrollgruppen. Drei der vier Zelllinien zeigten eine sehr ähnliche Wachstumskinetik nach Behandlung mit 2-ME. PaTu 8902, PaTu 8988t und MIAPaCa-2 Zellen reagierten mit einer Wachstumshemmung von 50-90% nach 5 Tagen Behandlung mit der geringen

Dosis von 2 $\mu$ M 2-ME. Die PaTu 8988s Zelllinie war deutlich weniger sensibel als die anderen. Deshalb lag die IC<sub>50</sub> in einem Bereich von 2-10 $\mu$ M bei den vier verwendeten Zelllinien.

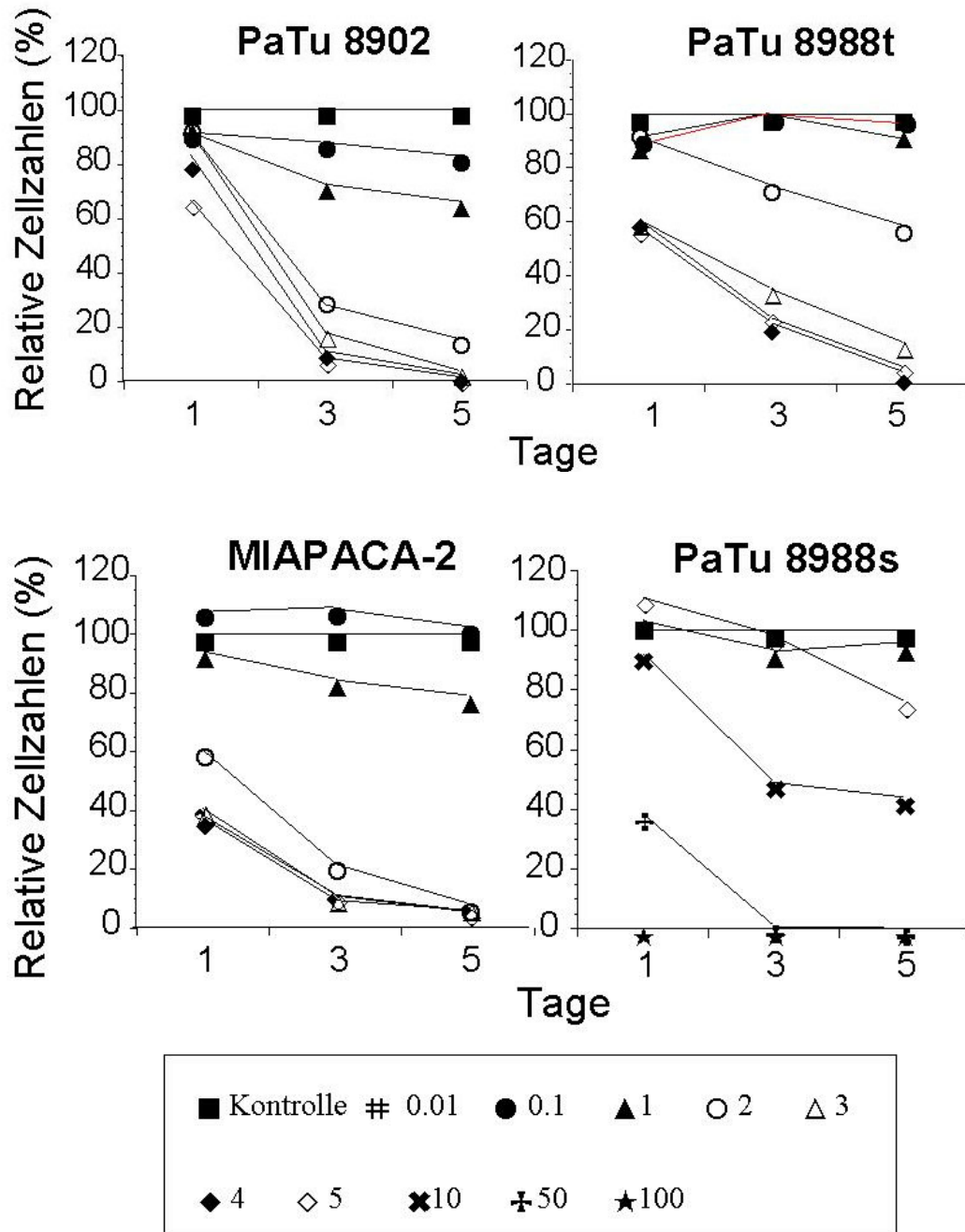


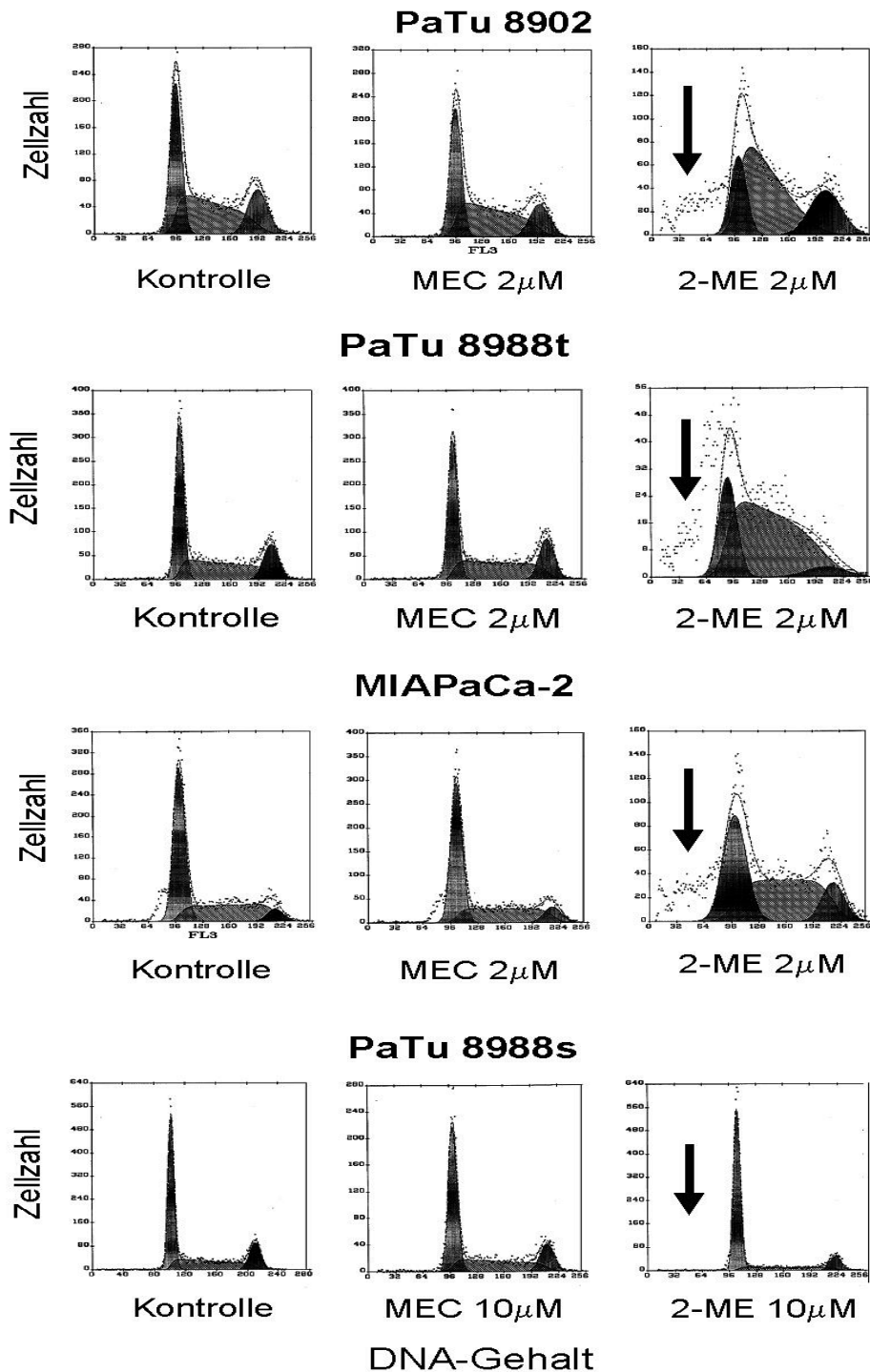
Abbildung 17

Proliferationsanalysen der vier verwendeten humanen Pankreaskarzinomzelllinien. Die Zellen wurden kontinuierlich 5 Tage lang mit unterschiedlichen Dosen 2-ME und MEC behandelt. (letzteres nicht abgebildet). Die abgebildeten Dosen sind in  $\mu$ M angegeben.

Untersuchungen unmittelbar vor den Zellzählungen unter dem Phasenkontrastmikroskop ergaben deutliche morphologische Veränderungen im Sinne von Zellschrumpfung und Isolierung aus dem Zellverband mit Nachbarzellen sowie Fragmentierung der Kerne analog zu den HCC Zellen. Dies sind deutliche Zeichen für Apoptose. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß der Mechanismus der Wachstumshemmung apoptotischer Zelltod ist, der zeit- und dosisabhängig ist. Die unbehandelten Kontrollen und die mit MEC behandelten Zellen zeigten keinerlei morphologische Veränderungen, blieben adhärent, vital und gleichmäßig verteilt.

#### 4.2.3. Induktion von Apoptose und Veränderungen des Zellzyklus durch 2-ME

Die vorgenannten Pankreaskarzinomzellen wurden wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, behandelt. Analog zu den anderen Versuchen wurden die Zellen mit 2-ME oder MEC inkubiert und dem Durchflußzytometer zugeführt. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse dargestellt. Man erkennt in dieser Abbildung einen normalen Zellzyklus in den nicht behandelten und in den mit MEC behandelten Kontrollgruppen. Die Zellverteilung ist typisch, die meisten Zellen befinden sich in der G1-Phase, erkennbar an dem hohen Peak. Rechts davon befindet sich die S-Phase, in der die DNA-Synthese stattfindet. Der DNA-Gehalt nimmt in dieser Phase zu. Der Peak rechts davon entspricht der G2/M-Phase, der Phase, aus der die Zellen in die Mitose einmünden, um so ihren DNA-Gehalt wieder zu halbieren. Die Zelllinien PaTu 8902, PaTu 8988t und MIAPaCa-2 zeigen in der mit 2-ME behandelten Gruppe ein morphologisch deutlich verändertes Zellzyklusmuster. Hier befinden sich Zellen in der Sub-G1 Region, was Zellen mit geringen Mengen DNA entspricht, einem typischen Muster bei Apoptose. Die S-Phase ist deutlich überrepräsentiert. Bei den weniger sensiblen Zellen PaTu 8988s sind keine Zellen in der Sub-G1 Region, sie haben auch keinen Zuwachs der S-Phase. Diese Zellen erleiden keinen apoptotischen Zelltod.



**Abbildung 18**

Durchflußzytometrische Ergebnisse nach Behandlung der vier Pankreaskarzinomzelllinien PaTu 8902, PaTu 8988t, MIAPaCa-2 und PaTu 8988s. Links ist jeweils die Kontrollgruppe ohne Behandlung, in der Mitte die Gruppe nach Behandlung mit MEC und rechts die mit 2-ME behandelten Gruppen dargestellt. Die Pfeile markieren die Sub-G1 Region, in der Zellen mit geringem DNA-Gehalt auftreten, wie es bei apoptotischen Zellen typisch ist. Die Behandlungsdosen sind in  $\mu\text{M}$  unter den jeweiligen Graphiken dargestellt.

Tabelle 6 zeigt die Anzahl der durch das Durchflußzytometer gemessenen apoptotischen Zellen je nach Behandlungsgruppe. Hier wird deutlich, daß die Zelllinien PaTu 8902, PaTu 8988t und MIAPaCa-2 einen signifikanten Zuwachs an apoptotischen Zellen in der mit 2-ME behandelten Gruppe, nicht jedoch in den beiden Kontrollgruppen aufweisen. PaTu 8988s, die in den anderen Untersuchungen weniger sensible Zelllinie hat indessen keinen Zuwachs der apoptotischen Zellen.

<b>Zelllinien</b>	<b>Kontrolle (% ± SEM)</b>	<b>MEC (% ± SEM)</b>	<b>2-ME (% ± SEM)</b>	<b>p-Wert</b>
MIAPaCa-2	4.7 ± 1.6	0.4 ± 0.4	97.3 ± 1.9	p < 0.0005
PaTu 8902	6.7 ± 2.4	8.4 ± 2.6	36.6 ± 6.1	p = 0.0001
PaTu 8988t	1.1 ± 1.1	2.2 ± 2.2	42.4 ± 13.4	p = 0.005
PaTu 8988s	0.0 ± 0	8.6 ± 5.2	5.6 ± 1.9	n.s.

*Tabelle 6*

Prozentueller Anteil der apoptotischen Zellen nach Behandlung mit PBS, MEC oder 2-ME.

In Tabelle 7 sind im selben Versuch wie in Abbildung 18 und Tabelle 6 die relativen Zellzahlen in den verschiedenen Zellzyklusphasen dargestellt.

	<b>PaTu 8902</b>			<b>PaTu 8988t</b>		
	Kontrolle	MEC	2-ME	Kontrolle	MEC	2-ME
G1	37.5	37.5	19.8	44.0	40.8	24.7
S	43.5	46.1	57.9	38.5	40.2	69.8
G2/M	19.0	16.4	22.3	17.5	19.0	5.5

	<b>MIAPaCa-2</b>			<b>PaTu 8988s</b>		
	Kontrolle	MEC	2-ME	Kontrolle	MEC	2-ME
G1	55.7	55.0	37.3	51.8	53.5	73.9
S	38.3	35.8	49.3	31.4	31.0	15.2
G2/M	6.0	9.2	13.4	16.8	15.5	10.9

*Tabelle 7*

Darstellung der relativen Zellzahlen in verschiedenen Zellzyklusphasen je nach Behandlungsgruppe

Man erkennt hier im Detail die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen. Es lässt sich auch die Akkumulation der Zellen in der S-Phase der Zelllinien PaTu 8902, PaTu 8988t und MIAPaCa-2 bei gleichzeitigem signifikanten apoptotischen Zelltod in den mit 2-ME behandelten Gruppen feststellen. Bei den PaTu 8988s Zellen ist der Anteil der Zellen in der S-Phase in der mit 2-ME behandelten Gruppe geringer, jedoch wird hier ein Zuwachs der Zellen in der G-1 Phase von 51,8% in der Kontrollgruppe auf 73,9% in der mit 2-ME behandelten Gruppe beobachtet. Es besteht hier also ein G1-Arrest, der ebenfalls zur Wachstumshemmung führt.

#### 4.2.4. Apoptosenachweis durch immunocytologische TUNEL-Färbung

Um den Nachweis des apoptotischen Zelltodes durch 2-ME weiter zu bestätigen, führten wir eine spezifische Färbung für DNA-Enden durch, die TUNEL-Färbung. Abbildung 19 zeigt representative Ausschnitte der gefärbten Präparate. Eine intensive Färbung bei den mit 2-ME und mit DNase vorbehandelten Zellen wird deutlich. Dies bedeutet, daß viele DNA Fragmente vorhanden sind, was apoptotischem Zelltod entspricht. Die Vorbehandlung mit DNase diene als Positivkontrolle. Zusätzlich erkennt man morphologische Veränderungen im Sinne eines apoptotischen Zelltodes in diesen Gruppen. Die Anzahl der apoptotischen Zellen betrug nach Auszählung zwischen 30 und 90%. Hingegen war in den Kontrollgruppen (PBS oder MEC) keinerlei Färbung erkennbar. Auch morphologische Veränderungen lagen nicht vor. Abbildung 20 zeigt im Balkendiagramm die Menge der apoptotischen Zellen nach Auszählung der nach TUNEL gefärbten Präparate. Die in den Kontrollgruppen befindlichen Zellen weisen eine Spontanapoptoserate von 2-8% auf. Ein Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den mit MEC behandelten Zellen besteht nicht. Bei Auszählung der mit 2-ME behandelten Zellen bemerkt man einen hohen Anteil apoptotischer Zellen von 30% bei den PaTu 8902 bis nahezu 100% bei den sensiblen MIAPaCa-2 Zellen. Die PaTu 8988s Zellen hingegen haben keinen gesteigerten Anteil an apoptotischen Zellen in der mit 2-ME behandelten Gruppe gegenüber den Kontrollgruppen trotz der hohen Dosierung von 10µM.

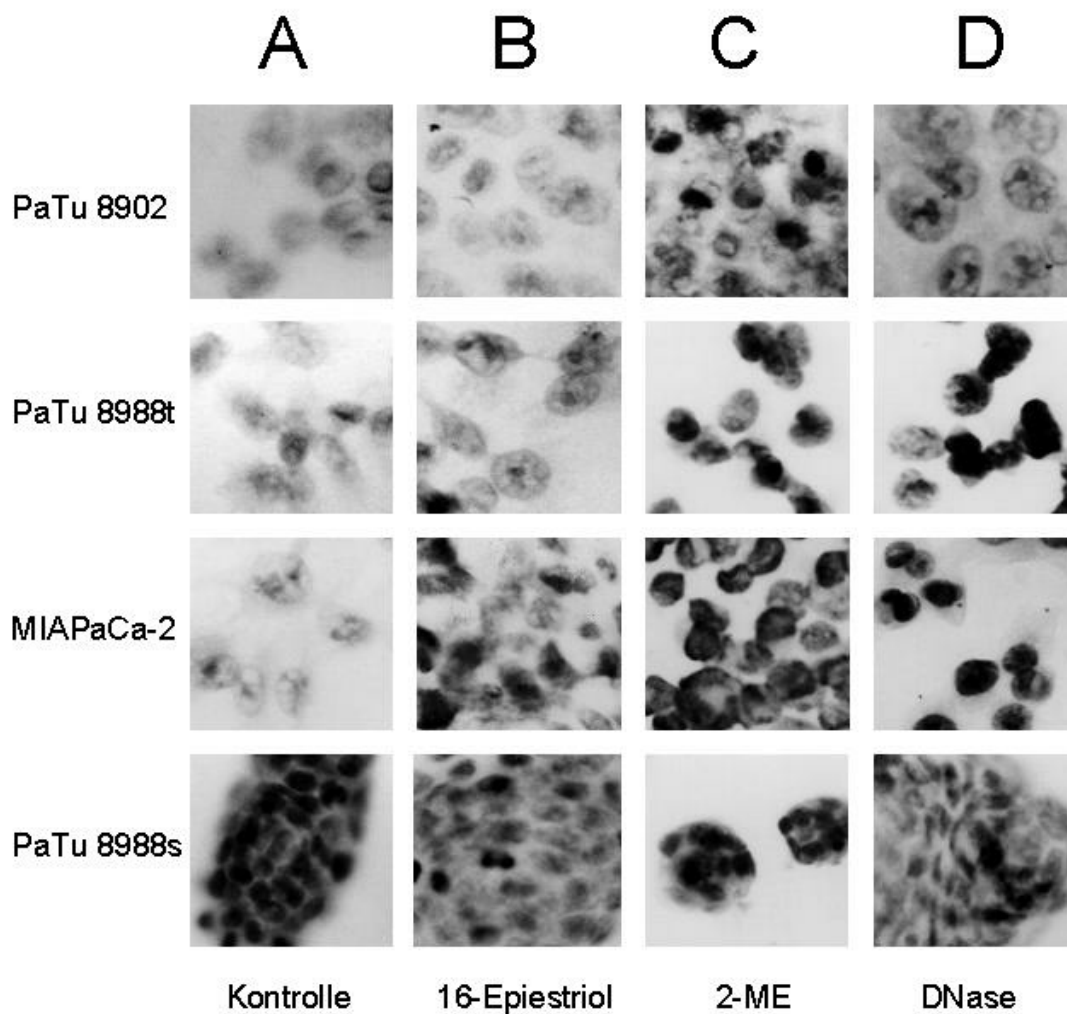


Abbildung 19

TUNEL Färbung der vier verwendeten Zelllinien mit unterschiedlichen Behandlungsgruppen. A: Mit PBS inkubierte Kontrolle; B: Mit 16-Epiestriol (MEC) inkubierte Kontrolle; C: Mit 2-ME inkubiert; D: Mit DNase inkubiert. Die Dosen für MEC und 2-ME waren 1,5µM für MIAPaCa-2, 2µM für PaTu 8988t und PaTu 8902 und 10µM für PaTu 8988s.

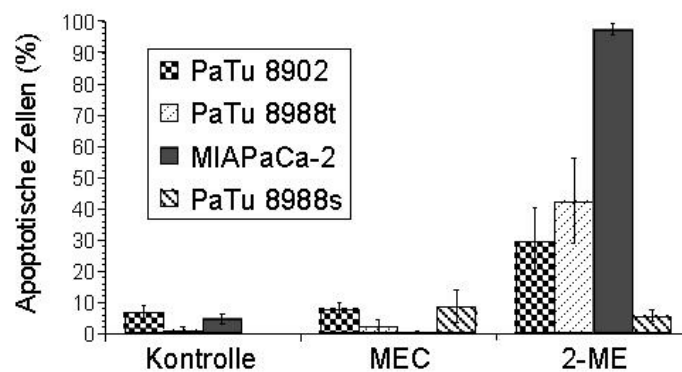
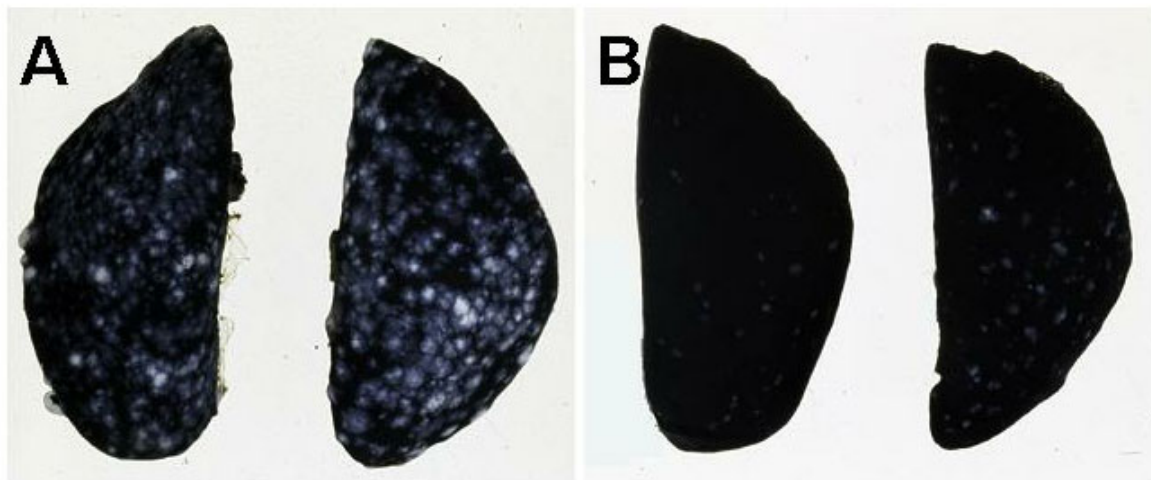


Abbildung 20

Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Behandlung wie in Abbildung 19.

#### 4.2.5. Wirksamkeit von 2-ME in vivo

Aufgrund der hohen Sensibilität der MIA PaCa-2 Zellen und des aggressiven Wachstums in Nacktmäusen entschieden wir uns für diese Zelllinie, um die in vivo Versuche durchzuführen. In dem verwendeten Lungenmetastasenmodell konnten in Vorversuchen zur Etablierung des Modells bei allen Tieren rasenartig wachsende Lungenherde induziert werden. Bei 10 Tieren pro Behandlungsgruppe beobachteten wir eine signifikante Wachstumshemmung in der mit 2-ME behandelten Gruppe. Kein Tier konnte tumorfrei den Versuch beenden. Abbildung 21 zeigt exemplarisch an je einem Lungenlappen zwei verschiedener Mäuse das Befundergebnis.



*Abbildung 21*

Exemplarisch dargestellte Lungenlappen von Mäusen nach Beendigung der Versuche. A: Kontrollgruppe mit Fütterung von DMSO in Olivenöl; B: Behandlung mit 1mg 2-ME pro Maus täglich über 3 Wochen nach Injektion der Zellsuspension. Die Abbildung zeigt Lungenlappen von jeweils zwei verschiedenen Mäusen aus Gruppen von je 10 Tieren.

Man erkennt deutlich die hohe Anzahl der Metastasen in der Kontrollgruppe. Hingegen waren die Metastasen in der mit 2-ME behandelten Gruppe deutlich weniger und kleiner. Die Mäuse aus der Kontrollgruppe hatten ein um 20% geringeres Gewicht als die Mäuse der Behandlungsgruppe und hatten den deutlichen klinischen Anschein der Tumorkachexie (nicht gezeigt). Abbildung 22 zeigt



ein Balkendiagramm mit der Anzahl der gezählten Metastasen aller Tiere im Durchschnitt pro Behandlungsgruppe. Man erkennt, daß die mit 2-ME behandelte Gruppe eine um 60% geringere Anzahl an Kolonien aufweist im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant ( $p < 0,0005$  im Students  $t$ -Test).

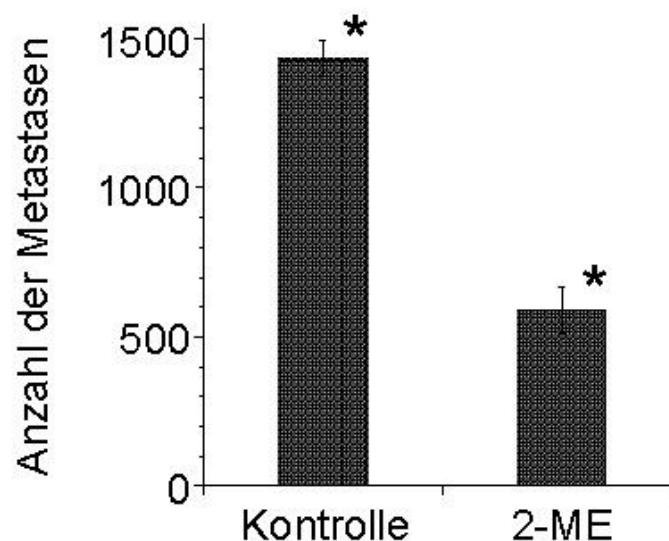
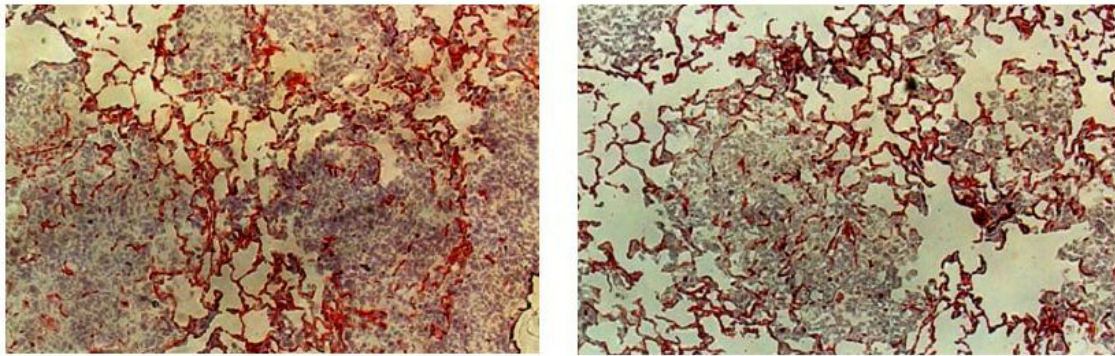


Abbildung 22

Anzahl der Lungenmetastasen auf der Oberfläche aller 5 Lungenlappen aller Mäuse bei  $n = 10$  pro Gruppe. (\* =  $p < 0,0005$ ).

#### 4.2.6. Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Blutgefäße

Um eine Hemmung der Angiogenese als möglichen Wirkmechanismus von 2-ME zu untersuchen, färbten wir Lungenschnitte nach Beendigung der Versuche mit einem spezifischen Marker für Endothelzellen, dem CD31. In den Schnitten sieht man, daß die Tumorkolonien nicht nur geringer in der Anzahl, wie oben beschrieben, sondern auch deutlich kleiner im Durchmesser sind. Eine Verringerung der Gefäßdichte in der mit 2-ME behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 23).



Kontrolle

2-ME

Abbildung 23

Darstellung der Dichte der Blutgefäße im Tumor mit einer Färbung für CD31.

Augenscheinlich ist kein Unterschied der Gefäßdichte in den Tumoren der beiden Behandlungsgruppen erkennbar. Die Auszählung der Gefäße zeigte einen nicht signifikanten Rückgang der Gefäßdichte um 18% in der Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrolle. (Abbildung 24).

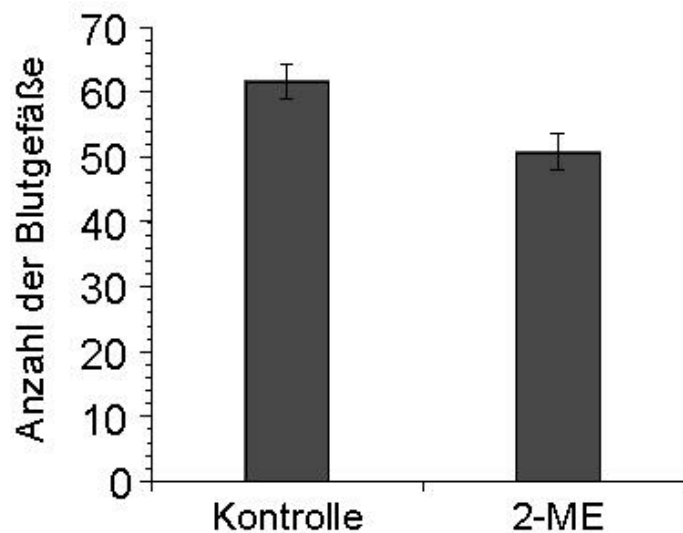


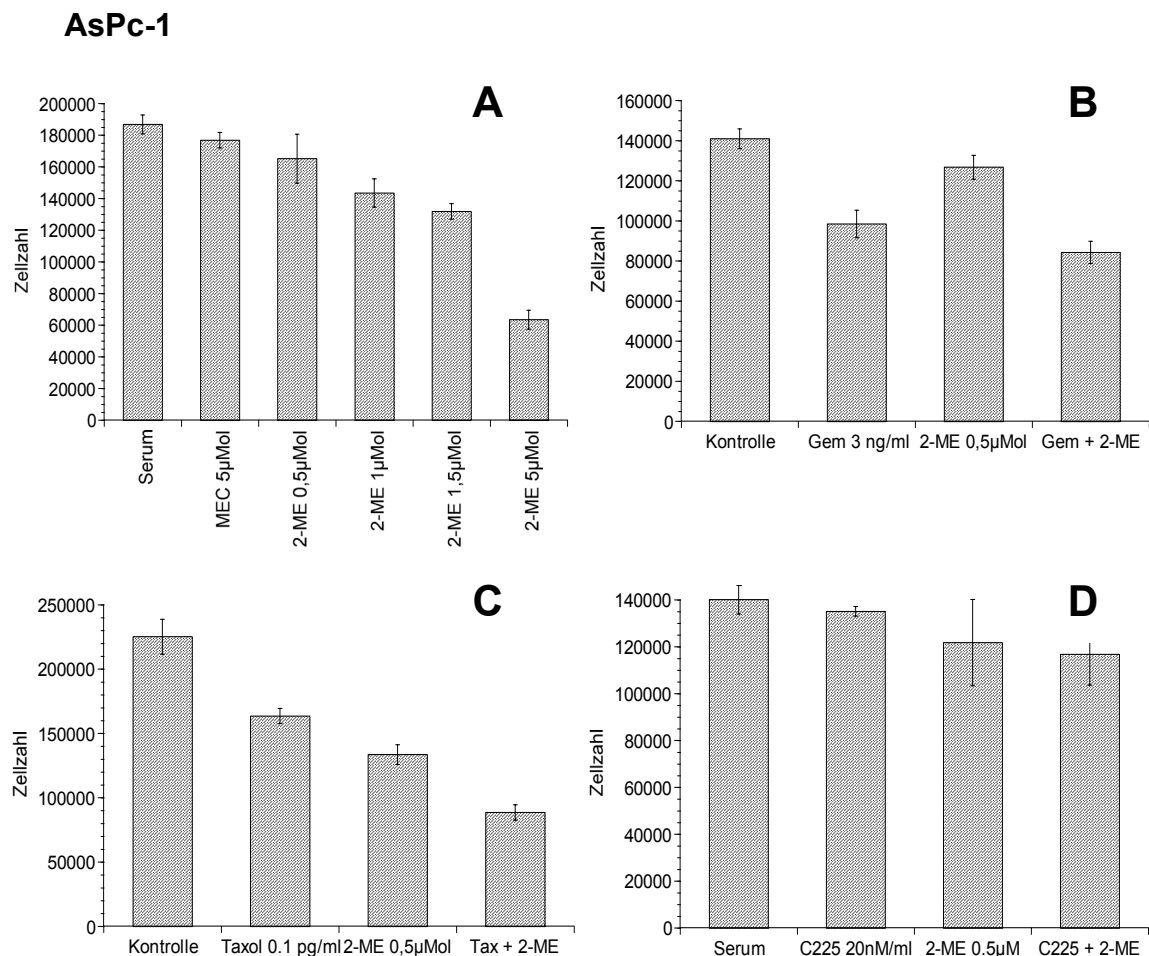
Abbildung 24

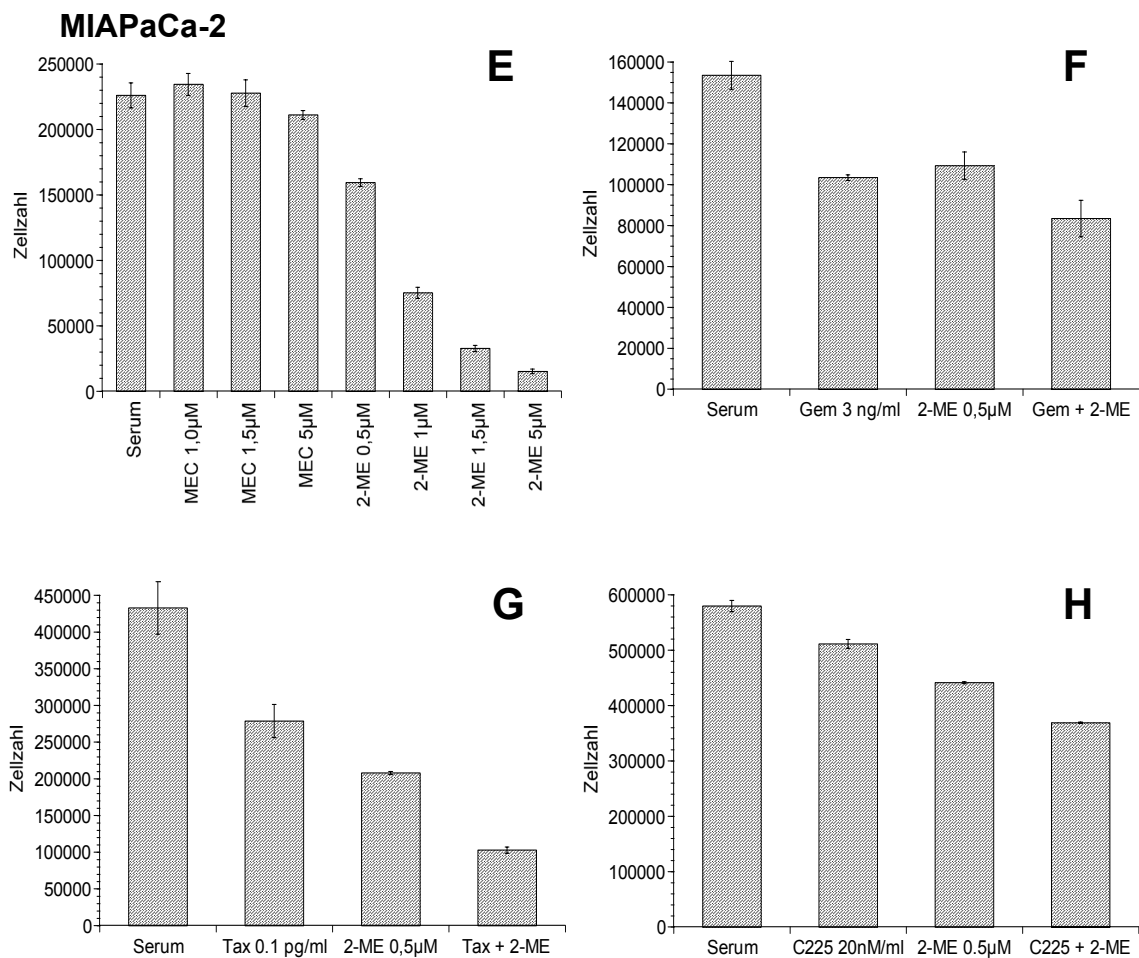
Balkendiagramm der Auszählung der Gefäßdichte innerhalb der Tumoren der beiden Behandlungsgruppen. Die Error bars zeigen die SEM. ( $p < 0.06$  im Students  $t$ -Test).

#### 4.2.7. Kombinationstherapie aus 2-ME und anderen Zytostatika

In der Klinik werden Chemotherapien häufig durch die Kombination aus zwei oder drei Substanzen entweder in der Effektivität erhöht, oder es werden die Nebenwirkungen durch eine jeweils reduzierte Dosis verringert. Um in vitro eine Zunahme der Effektivität einschätzen zu können, wurde 2-ME mit unterschiedlichen Substanzen kombiniert angewendet. Untersucht wurden hierbei Gemcitabine, Docetaxel und der monoklonale Anti-EGF Rezeptor Antikörper C225. Letzterer ist ein chimärer Human-Maus Antikörper, der spezifisch an den EGF Rezeptor (EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor) bindet und so das EGF Rezeptor vermittelte Wachstum hemmt.

Die Ergebnisse zeigen, daß es jeweils zu einer gewissen additiven Wachstumshemmung kommt. In Abbildung 25 sind die Proliferationsanalysen der zwei verwendeten Zelllinien AsPc-1 und MIAPaCa-2 nach 5 tägiger Behandlung mit 2-ME alleine oder in Kombination mit Gemcitabine, Docetaxel oder C225 dargestellt.





**Abbildung 25**

Proliferationsanalysen der zwei Zelllinien AsPc-1 (A-D) und MIAPaCa-2 (E-H) nach 5 tägiger Behandlung mit 2-ME alleine (A, E) oder kombiniert mit Gemcitabine (B, F), Taxol (C, G) oder C225 (D, H). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (System error of the mean).

Die AsPc-1 Zellen zeigten insgesamt etwas weniger Wachstumshemmung durch 2-ME alleine. 1µM 2-ME bewirkte eine Hemmung von ca. 22% (A). Hingegen konnte 1µM 2-ME eine ca. 65%ige Wachstumshemmung der MIAPaCa-2 Zellen bewirken (E). Gemcitabine und Docetaxel alleine waren jeweils in der Lage, eine Wachstumshemmung bei beiden Zelllinien zu bewirken. Gemcitabine führte bei der geringen Dosis von 3ng/ml in beiden Zelllinien zu einer Hemmung von 30%, die mit 0,5µM 2-ME im Sinne einer additiven Wachstumshemmung auf 43% bei den AsPc-1- (B) und auf 49% bei den MIAPaCa-2 Zellen (F) gesteigert werden konnte. Docetaxel hemmte das Wachstum in einer Dosis von 0,1pg/ml um 28% in den AsPc-1- und um

37% in den MIAPaCa-2 Zellen. Der Zusatz von 0,5µM 2-ME addierte die Wachstumshemmung auf 63% bei den AsPc-1- (C) und auf 75% bei den MIAPaCa-2 Zellen (G). Der Antikörper C225 zeigte nur eine geringe Wachstumshemmung von 4% bei den AsPc-1 Zellen und 13% bei den MIAPaCa-2 Zellen. Durch Zugabe von 0,5µM 2-ME konnte auch hier eine gesteigerte Wachstumshemmung auf 15% bei den AsPc-1- (D) und auf 38% bei den MIAPaCa-2 Zellen (H) erreicht werden.

#### 4.2.8. Apoptosenachweis nach Kombinationsbehandlung

Fluoreszenzfärbungen zur Darstellung der Kernmorphologie wurden angefertigt, um einen eventuellen Zuwachs der Apoptoserate nach Zugabe der Zytostatika darzustellen. Bei beiden Zelllinien wurde ein Zuwachs der Apoptoserate nach Behandlung mit 2-ME alleine festgestellt wie auch in anderen Versuchen bereits geschildert. Die Zugabe von Gemcitabine, Taxol oder C225 bewirkte jedoch keinen weiteren Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ergab die Kombination von 2-ME mit Gemcitabine und Docetaxel bei beiden verwendeten Zelllinien eine additive Wachstumshemmung bis auf 63% bei AsPc-1 und auf 75% bei MIAPaCa-2 Zellen. Die Kombination von 2-ME und dem monoklonalen Anti-EGF Rezeptor Antikörper zeigte ebenfalls eine Steigerung der Wachstumshemmung auf 15% bzw. 35%. Eine Zunahme der Apoptoseinduktion über das Ausmaß der 2-ME Wirkung hinaus konnte durch die Zugabe von Gemcitabine und Docetaxel aber nicht erreicht werden.

### 4.3. 2-ME zur Behandlung des Bronchialkarzinoms

#### 4.3.1. Kombination aus 2-ME und Gentherapie in vitro

2-ME hat die Eigenschaft, das p53 Protein in den Wild-Typ p53 exprimierenden A549 Zellen durch Stabilisierung und Verlängerung der Halbwertszeit zu vermehren, wie in Voruntersuchungen gezeigt wurde (Mukhopadhyay et al. 1997). Danach war es von Interesse, Folgeuntersuchungen mit einer Kombination aus 2-ME und dem Wild-Typ p53 exprimierenden Adenovirus (Ad-p53) durchzuführen. Dies sollte insbesondere im Tierversuch untersucht werden, wobei 2-ME wiederum systemisch oral und das Adenovirus systemisch intravenös verabreicht werden sollte. Da bei einer systemischen Erkrankung wie einer multiplen Lungenmetastasierung eine systemische Therapie erfolgen muß, sollte untersucht werden, ob in der genannten Kombination ein Effekt auf das Wachstum der Tumorherde zu beobachten ist. Der p53 stabilisierende Effekt von 2-ME soll das vom Adenovirus stammende p53 in der Expression erhöhen, um einen ausreichenden Spiegel p53 Protein in der Tumorzelle zu erhalten, um die Tumorzelle zu töten oder eine Wachstumshemmung zu erzeugen. Vorbereitend wurde eine dosisabhängige Wirkung von 2-ME und Ad-p53 auf die A549 Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, daß Ad-p53 in einer Menge von 30 MOI (multiplicity of infection) und die geringe Dosis von 1µM oder weniger 2-ME keine Wachstumshemmung der A549 Zellen hervorrief. Die Kombination aus beiden Komponenten ergab jedoch eine signifikante Wachstumshemmung (Abbildung 26). In den hier angegebenen Dosen kam es bei den Zellen aus den Kontrollgruppen, aber auch bei den Zellen, die entweder mit 2-ME oder Ad-p53 alleine behandelt wurden, zu einem kontinuierlichen Wachstum ohne signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Wenn 2-ME und Ad-p53 kombiniert wurden, kam es nicht nur zu einer Wachstumshemmung der Zellen, sondern zu einem Rückgang der Zellzahlen nach 5 Tagen.

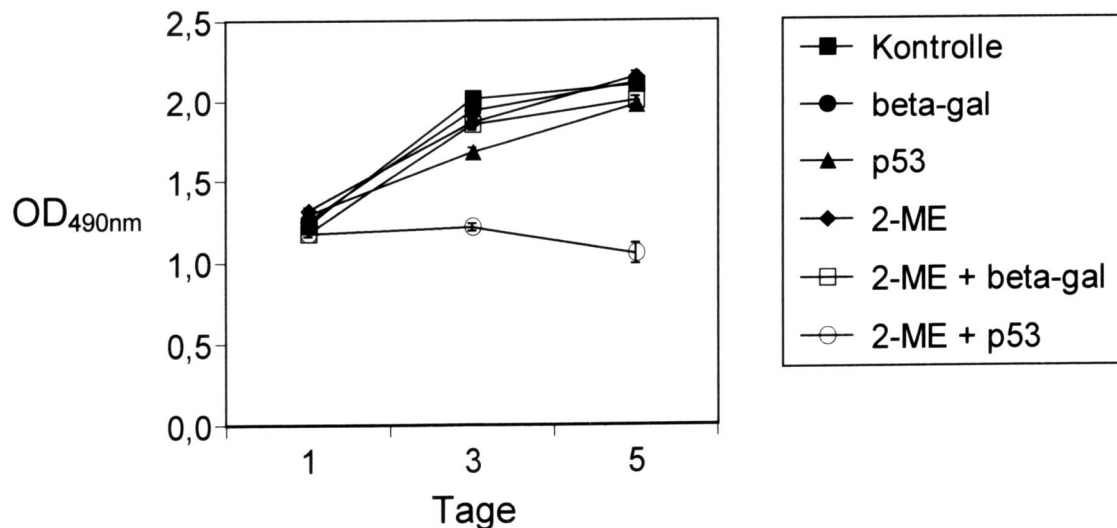


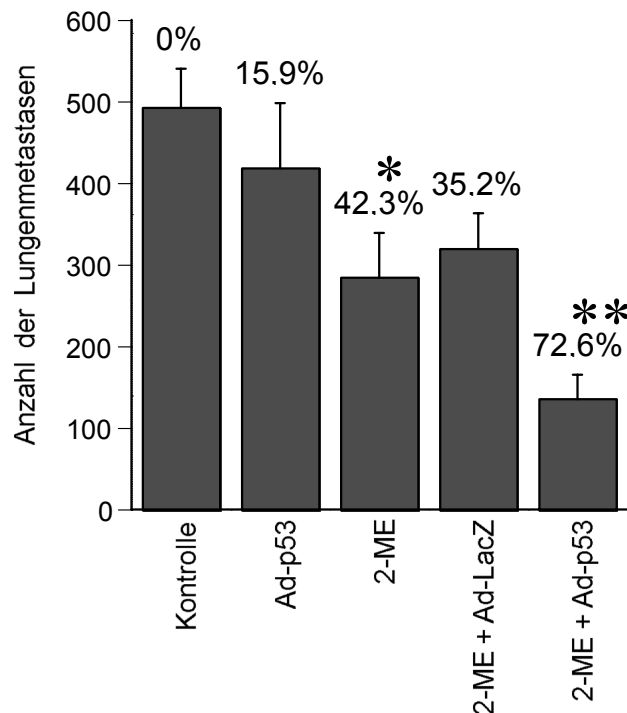
Abbildung 26

Wachstumsanalysen von A549 Zellen nach 5-tägiger Behandlung mit  $1\mu\text{M}$  2-ME, Ad-p53 30 MOI (multiplicity of infection), oder der Kombination aus beiden.

#### 4.3.2. Kombination aus 2-ME und Gentherapie in vivo

Um diesen Effekt in vivo nachvollziehen zu können, injizierten wir  $2 \times 10^6$  A549 Zellen in die Schwanzvene von Nacktmäusen, um Lungenmetastasen zu induzieren. Das Therapieschema wurde wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Nach 21 Tagen Versuchsdauer wurden die Tiere getötet und die Kolonien auf der Lungenoberfläche ausgezählt. Diese Versuche wurden dreimal durchgeführt. Die Zählung der Metastasen erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher mit einer Abweichung der Zahlen, die unter 10% lagen. Abbildung 27 zeigt die Anzahl der Metastasen auf der Lungenoberfläche der einzelnen Gruppen.

Mit Ad-p53 in der benutzten Dosis von drei Applikationen mit  $5 \times 10^8$  pfu (plaque forming units) konnte eine statistisch nicht signifikante Hemmung des Metastasenwachstums um 15,9% ( $p = 0.12$ ) erreicht werden. Hingegen führte die Monotherapie mit 2-ME in der Dosis von 75mg/kg KG zu einer Wachstumshemmung um 42,3% im Vergleich mit den unbehandelten Kontrolltieren ( $p < 0,0001$ ). Die Kombination aus 2-ME und Ad-p53 konnte das Metastasenwachstum weiter bis zu einer 72,6%igen Hemmung senken ( $p < 0,05$  gegen 2-ME alleine). In anderen Experimenten mit weiteren Kontrollgruppen (16-Epiestriol für 2-ME und Ad-LacZ für Ad-p53) zeigte sich keinerlei Effekt auf das Tumorwachstum (keine Abbildung).



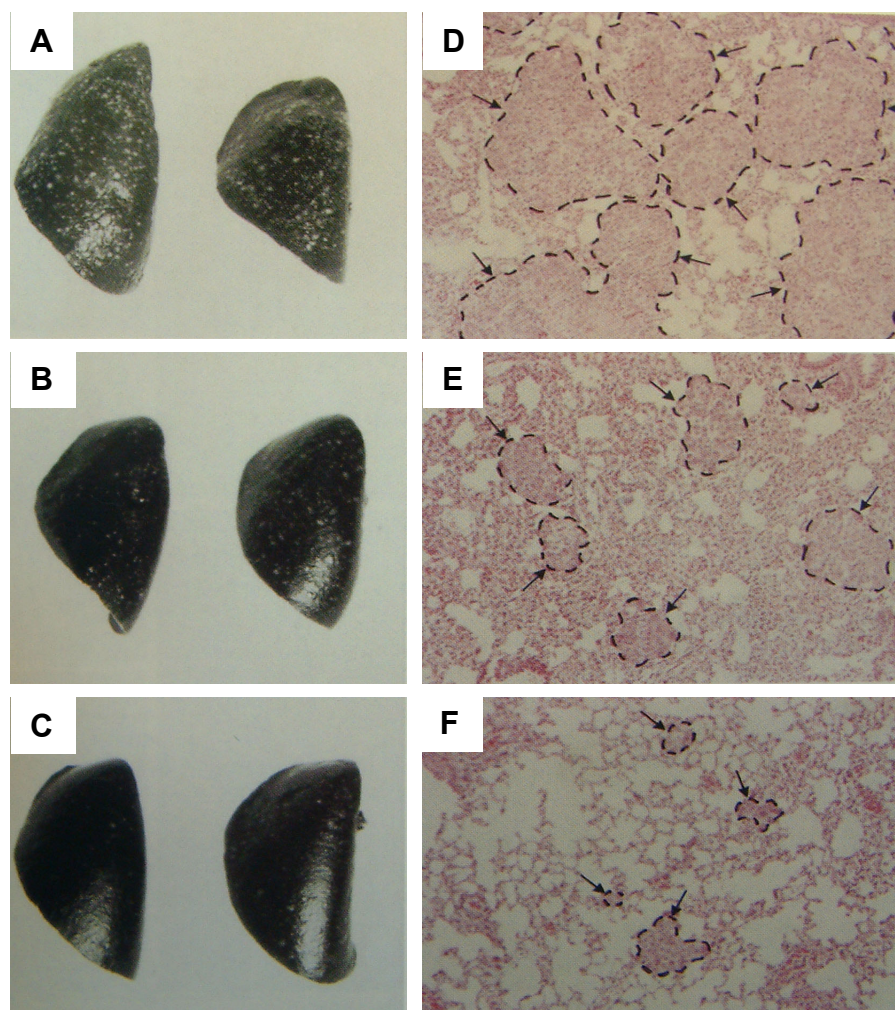
**Abbildung 27**

Anzahl der Lungenmetastasen auf der Oberfläche aller 5 Lungenlappen pro Tier bei 10 Tieren pro Gruppe. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. \* = signifikant weniger Kolonien als unbehandelte Kontrollen ( $p < 0,0001$ ); \*\* = signifikant weniger Kolonien als 2-ME alleine ( $p < 0,05$ ).

Aus diesem Versuch zeigt Abbildung 28 exemplarisch Lungenlappen von je zwei Tieren aus der Kontrollgruppe ohne Therapie (A und D), mit 2-ME alleine behandelt (B und E) und mit der Kombination aus 2-ME und Ad-p53 behandelt (C und F). Bei den makroskopischen Bildern A-C wird schon leicht erkennbar, dass die Anzahl der Lungenmetastasen in der mit 2-ME alleine behandelten Gruppe (B) deutlich geringer ist, als in der nicht behandelten Kontrollgruppe (A). Nach dem Zusatz von Ad-p53 sieht man einen weiteren Rückgang der Anzahl der Metastasen. Auch die Größe der einzelnen Herde wirkt in den Behandlungsgruppen makroskopisch schon geringer als in der Kontrollgruppe. Immunhistochemische Färbungen mit H&E (Abbildung 28D-F) verdeutlichten, daß nicht nur die Anzahl der Kolonien reduziert waren, sondern auch der Durchmesser der einzelnen Herde, wie bereits bei den makroskopischen Bildern (A-C) vermutet. Der mittlere Durchmesser  $\pm$  SD von 20 Kolonien pro Tier innerhalb der unbehandelten Kontrollgruppe betrug  $245 \pm 40\mu\text{m}$ ,  $108 \pm 13\mu\text{m}$  bei der 2-ME alleine Gruppe und  $54 \pm 5\mu\text{m}$  bei der Gruppe der



Kombination aus 2-ME und Ad-p53 ( $p = 0,0001$ ). Um die Reduktion der gesamten Tumorlast einschätzen zu können, kann man sie durch Einbeziehen der beiden Parameter Anzahl und der Größe der Tumorherde errechnen. Der mittlere Durchmesser der Herde wird zur Berechnung des Tumolvolumens benutzt. Das Tumolvolumen wird dann mit der Anzahl der Herde multipliziert. Somit kann berechnet werden, daß die Kombination aus 2-ME und Ad-p53 eine 336-fache Reduktion der gesamten Tumorlast im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe bewirkt. Eine 21-fache Reduktion wurde durch 2-ME alleine und eine zusätzliche 16-fache Reduktion durch den Zusatz von Ad-p53 erreicht.

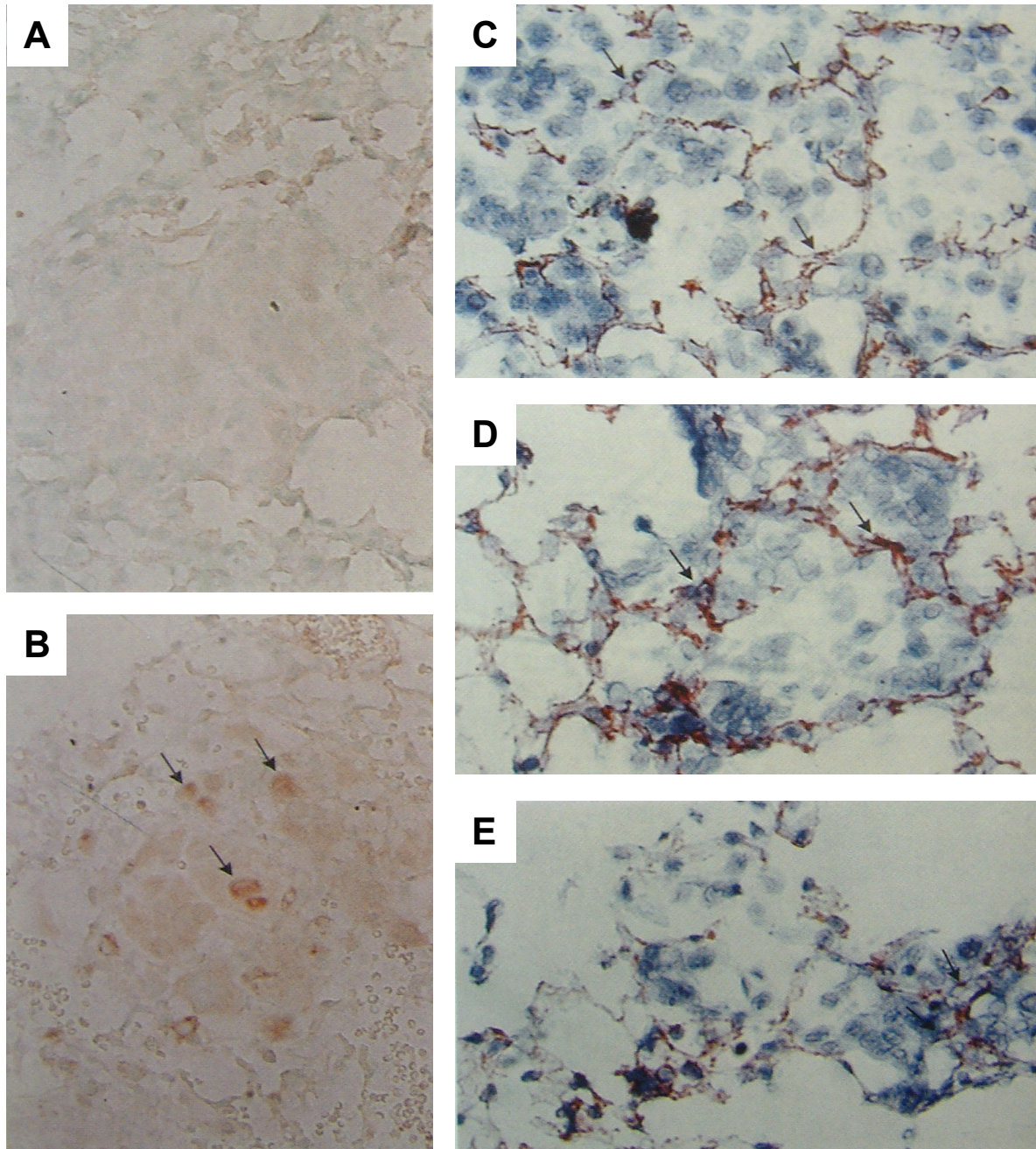


*Abbildung 28*

Lungenmetastasen auf der Oberfläche von je zwei repräsentativen Tieren aus verschiedenen Behandlungsgruppen makroskopisch (A-C) und immunhistochemisch mit H&E Färbung (D-F). Kontrollgruppe: A,D; 2-ME alleine: B,E; 2-ME + Ad-p53: C,F.

Die Metastasen im histologischen Bild sind mit gestrichelter Linie eingrahmt und durch Pfeile markiert.

Um nun festzustellen, ob die in den in vitro Untersuchungen beobachtete Stabilisierung des p53 Proteins mit anschließender Akkumulation innerhalb der Zellen auch in vivo eintritt, färbten wir die Lungen immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen p53 (Abbildung 29).



*Abbildung 29*

Färbung von Lungenmetastasen für das p53 Protein ohne Behandlung (A) und mit 2-ME Behandlung (B). Die Pfeile markieren auf p53 positiv gefärbte Zellen. Schnitte mit



CD31 zur Darstellung der Gefäße gefärbt (C-E). C: unbehandelt, D: mit 2-ME alleine behandelt, E: mit 2-ME und Ad-p53 behandelt.

Wir konnten an den Paraffinschnitten erkennen, dass die Metastasen der Tiere, die nicht mit 2-ME behandelt wurden, keine oder nur eine sehr schwache p53 Färbung zeigten (Abbildung 29A), wie es bei Wild-Typ p53 exprimierenden Zellen wie der A549 Zelllinie typisch ist. Die Metastasen der mit 2-ME behandelten Tiere hingegen zeigten eine kräftige Färbung und somit eine hohe Expression des p53 Proteins (Abbildung 29B). Eine signifikante mittlere Anzahl von  $44 \pm 4\%$  SD von 100 gezählten Tumorherden in drei Mäusen färbte sich stark positiv für p53 in der mit 2-ME alleine behandelten Gruppe. In der Kontrollgruppe färbten sich  $12 \pm 1\%$  von 100 Herden stark positiv für p53 ( $p < 0,0001$ ). Diese unterschiedliche Färbung für das p53 Protein läßt die Vermutung zu, daß die Wachstumshemmung zumindest partiell durch die Steigerung der p53 Überexpression durch 2-ME bewirkt wird. Die Anzahl der Blutgefäße innerhalb der Tumorherde zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Abbildung 29 C-E). Die mittlere Anzahl  $\pm$  SD in 10 zufällig ausgewählten Herden pro Lunge von je drei Mäusen betrug in der Kontrollgruppe  $44 \pm 3$ , in der 2-ME Gruppe  $40 \pm 2$  und in der 2-ME + Ad-p53 Gruppe  $42 \pm 2$  ( $p = 0,81$  im ANOVA Test).

Die Kombination von 2-ME und dem Wild-Typ p53 Vektor führte also zu einem hochsignifikanten Rückgang von Lungenmetastasen im Mausmodell. Der Wirkmechanismus ist dabei offenbar eng verknüpft mit dem durch 2-ME induzierten Anstieg von p53. Dagegen war eine antiangiogenetische Wirkung in diesem System nicht nachweisbar.

#### 4.4. Wirkung von 2-ME auf multiresistente humane Zellen

##### 4.4.1. Cisplatinresistente Bronchialkarzinomzellen

Um die Wirkung von 2-ME auf das häufige und klinisch relevante Problem der Chemoresistenz von Tumoren zu untersuchen, verwendeten wir verschiedene Zellen, die ein unterschiedliches Ausmaß an Resistenz gegen verschiedene Zytostatika besitzen. Die Bronchialkarzinomzelllinie H1299 erlangte wie in Material und Methoden beschrieben, durch eine kontinuierliche Inkubation mit Cisplatin eine Resistenz gegenüber der zuvor letalen Dosis von  $2\mu\text{g/ml}$ . Abbildung 30 zeigt eine dosisabhängige Wachstumsreduktion durch 2-ME bei den resistenten Zellen.  $2\mu\text{M}$  2-ME führten zu einer Hemmung um 69%. Das Ausmaß der Hemmung entsprach dem der parentalen, nicht resistenten Zellen und in etwa den untersuchten Tumorzellen anderer Tumortypen, wie beim HCC, Pankreaskarzinom und Bronchialkarzinom gezeigt.

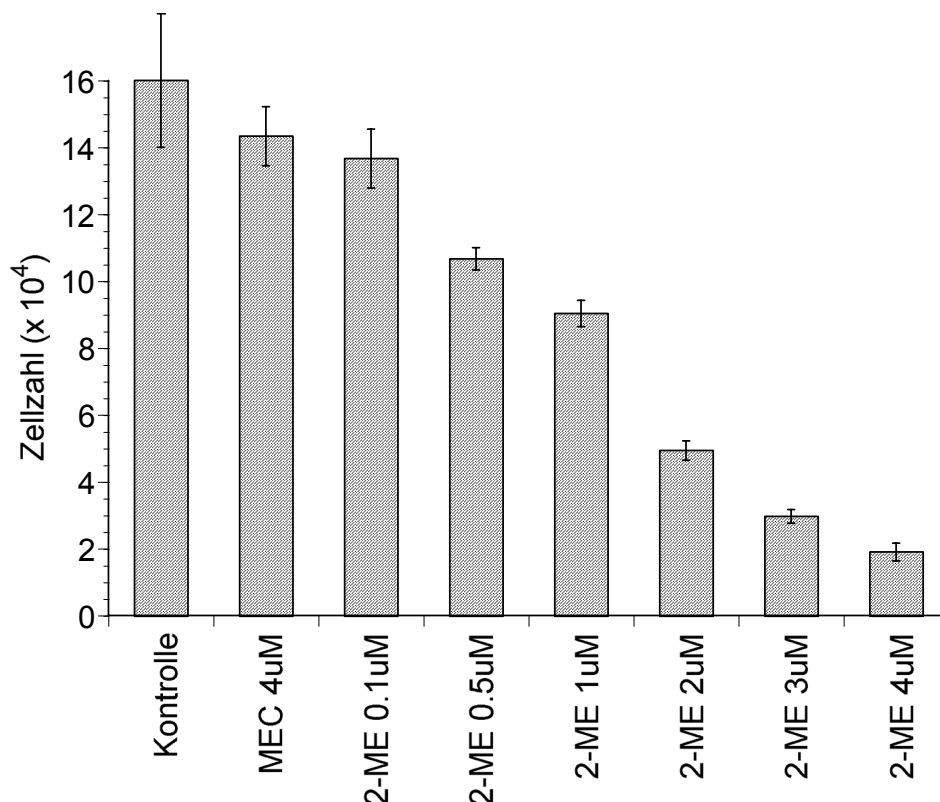
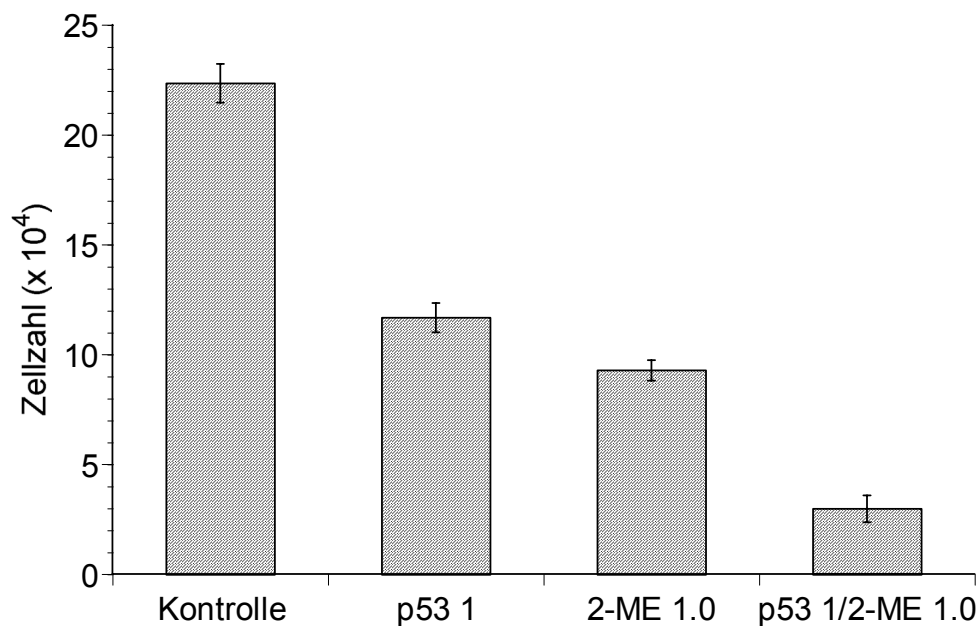


Abbildung 30

H1299 Bronchialkarzinomzellen resistent bei  $2,0\mu\text{g/ml}$  Cisplatin nach 5 Tagen Behandlung mit 2-ME in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Konzentrationen sind in  $\mu\text{M}$  angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Wenn dieselben cisplatinresistenten Zellen mit einer Kombination aus 2-ME und einem Adenovirus inkubiert wurden, die den Wild-Typ des p53 Gens exprimieren (Ad-p53), konnte eine additive Wachstumshemmung beobachtet werden. Mit einer MOI (multiplicity of infection) von 1 konnte durch das Adenovirus das Wachstum nach 5 Tagen um 50% gehemmt werden. 2-ME mit einer Dosis von 1.0µM hemmte das Wachstum um 59%. Die Kombination der beiden Substanzen ergab eine Wachstumshemmung von 87% bei dieser Bronchialkarzinomzelllinie (Abbildung 31). Somit scheint auch der Gentransfer mit p53 die Chemoresistenz zu überwinden. Die Kombination aus dem Gentransfer und 2-ME wirkt unabhängig vom Resistenzniveau additiv.



**Abbildung 31**

H1299 Bronchialkarzinomzellen resistent bei 2,0µg/ml Cisplatin nach 5 Tagen Behandlung mit 2-ME 1.0µM, Ad-p53 MOI 1 oder der Kombination aus beiden. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

#### 4.4.2. Multiresistente Pankreaskarzinomzellen

Uns interessierte in diesem Zusammenhang auch die Wirkung auf Zellen von Pankreaskarzinomen. Dazu stand uns eine humane Zelllinie vom Pankreaskarzinom in 3 Klonen zur Verfügung, um sie an verschiedenen Zytostatika zu testen (Abbildung

32). Ein Klon war eine parentale chemosensible Zelllinie EPP85-181P, ein weiterer Klon war eine *mdr-1* Gen positive chemoresistente Zelllinie EPP85-181RDB und der dritte Klon war eine *mdr-1* Gen negative resistente Zelllinie EPP85-181RNOV. Die Resistenz bestand gegen Mitoxantrone, Daunorubicin, Etoposide, Teniposide, Amsacrine, Cisplatin, Paclitaxel und Vindesine. Die *mdr-1* positiven Zellen zeigten eine bis zu 1000-fach erhöhte  $IC_{50}$  gegen Paclitaxel, Vindesine, Daunorubicin und Mitoxantrone. *Mdr-1* negative Zellen waren etwas weniger resistent mit einer Zunahme der  $IC_{50}$  um das 10-fache gegen Vindesine, Amsacrine und Mitoxantrone.

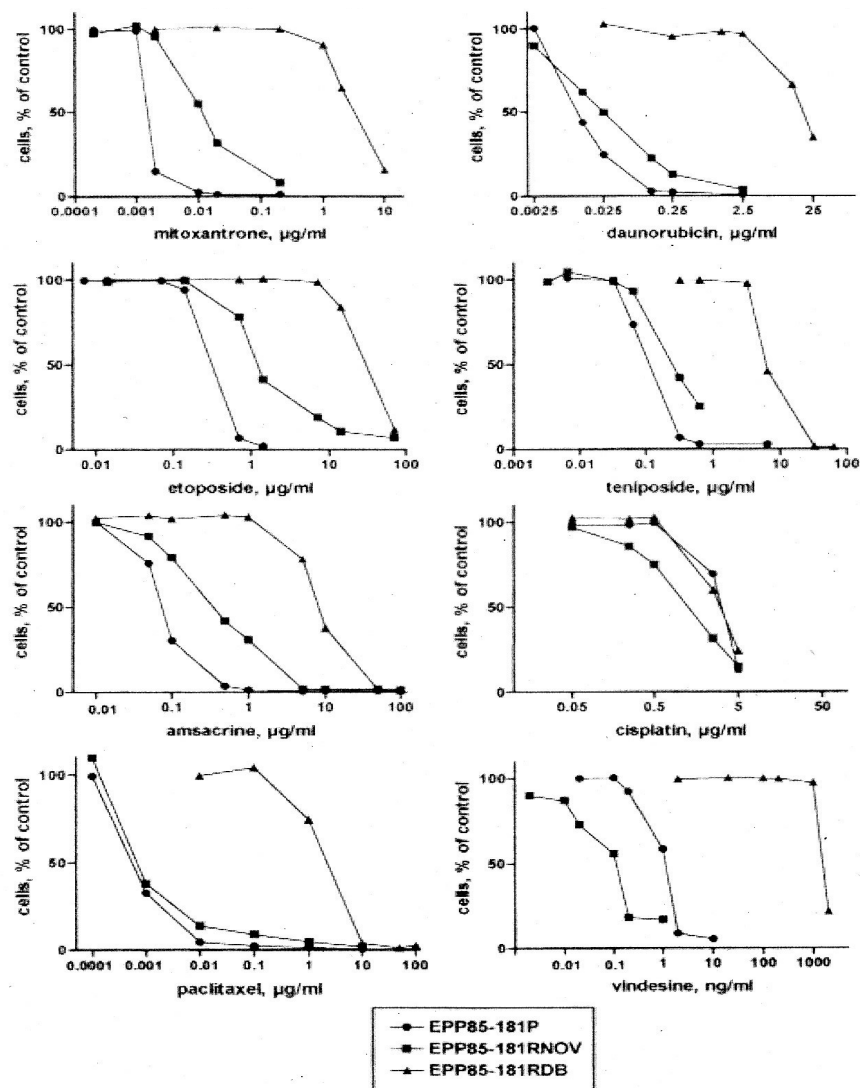
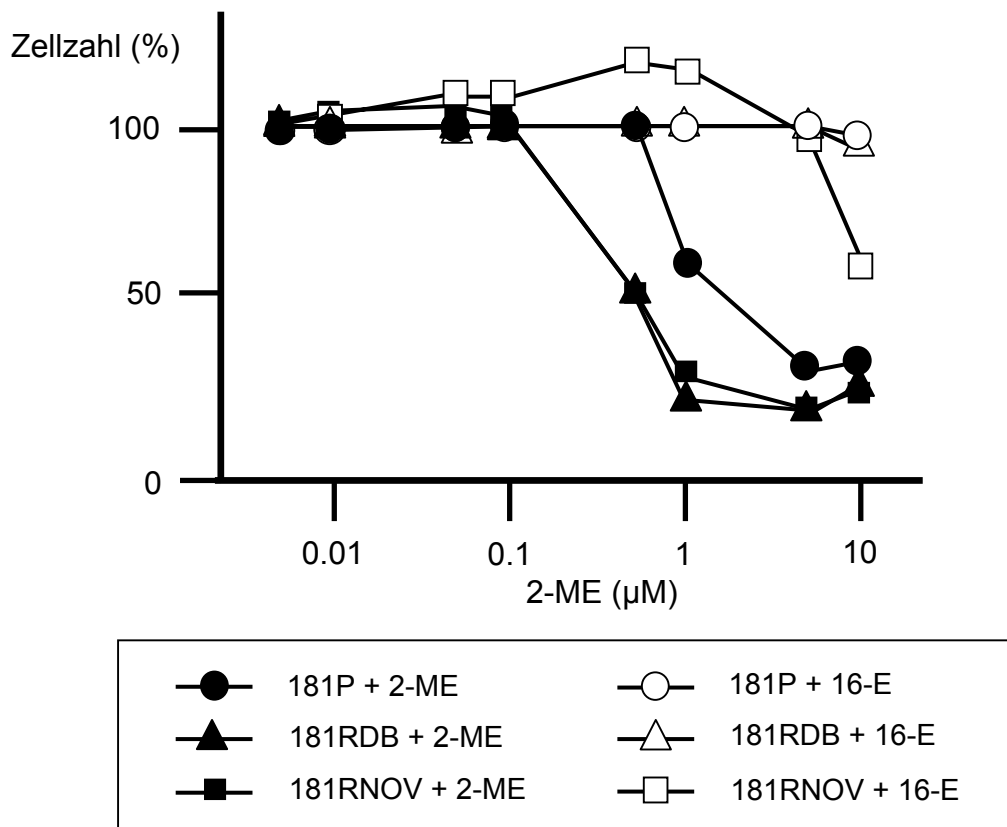


Abbildung 32

Resistenzniveau der drei Zellklone eines humanen Pankreaskarzinoms EPP85-181P (sensibel), EPP85-181RDB (*mdr-1* Gen positiv) und EPP85-181RNOV (*mdr-1* Gen negativ). Insbesondere der *mdr-1* Gen positive Klon EPP85-181RDB zeigte eine hohe Resistenzrate gegen die meisten Zytostatika.

Nach Behandlung der drei verwendeten Klone mit 2-ME zeigte sich, dass alle Zellklone komplett sensibel waren und an der Proliferation gehindert werden konnten. Verglichen mit den Ergebnissen der anderen verwendeten Zelllinien MIAPaCa-2, AsPc-1, PaTu 8902, PaTu 8988s und PaTu 8988t lag die  $IC_{50}$  bei den resistenten Zellen mit  $1,65\mu M$  für EPP85-181P,  $0,56\mu M$  für EPP85-181RDB und mit  $0,56\mu M$  für EPP85-181RNOV in einem sehr ähnlichen Bereich (Abbildung 33). Insbesondere ist der sehr resistente *mdr-1* Gen positive Klon EPP85-181RDB gleichermaßen sensibel auf 2-ME wie die sensible Zelllinie.



**Abbildung 33**

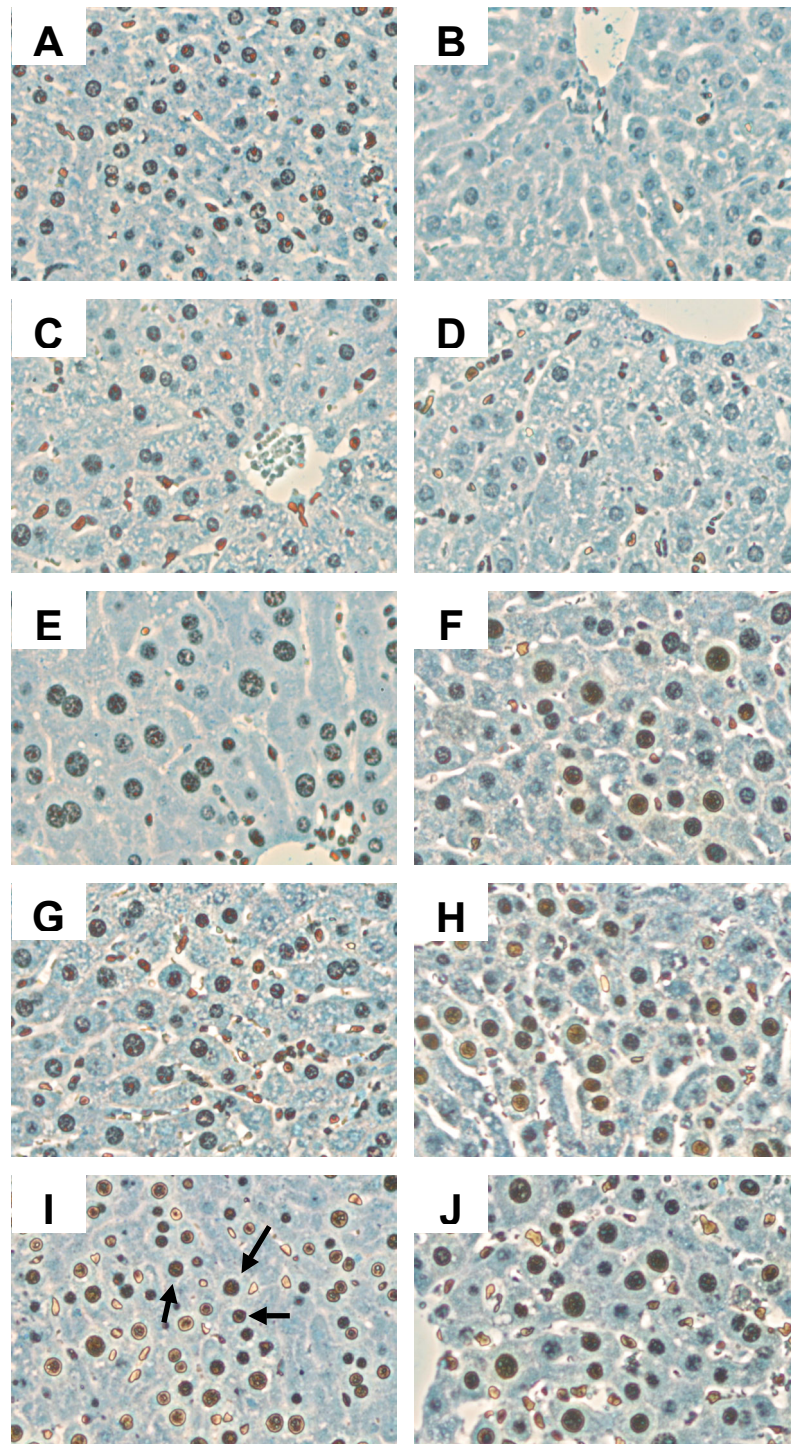
Bestimmung der  $IC_{50}$  der drei Klone des humanen Pankreaskarzinoms EPP85-181P (sensibel), EPP85-181RDB (*mdr-1* Gen positiv) und EPP85-181RNOV (*mdr-1* Gen negativ). Man erkennt eine komplette Sensibilität gegenüber 2-ME. (2-ME: 2-Methoxyestradiol; 16-E: 16-Epiestriol).

2-ME ist also auch bei hochresistenten Bronchialkarzinomzellen und Pankreaskarzinomzellen wirksam. Offenbar spielt dabei der Resistenzmechanismus eine untergeordnete Rolle.



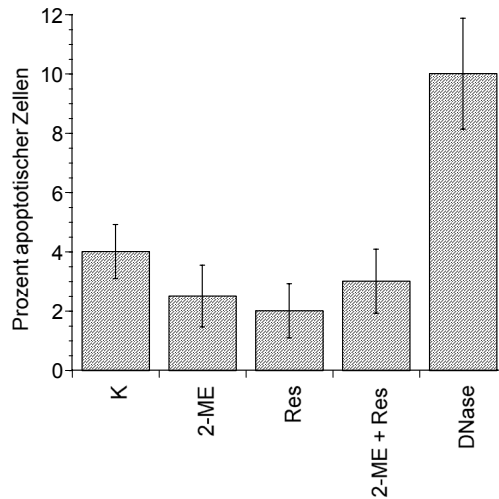
#### **4.5. Toxizität von 2-ME in vivo**

Um die Toxizität von 2-ME auf proliferierende normale Zellen untersuchen zu können, verwendeten wir ein Tiermodell mit Leberresektion an Nacktmäusen, wie in Material und Methoden beschrieben. Keines der Tiere hatte klinische Zeichen einer Leberinsuffizienz oder anderer Nebenwirkungen durch die Operation. Nach Entnahme der Lebern zeigte sich, daß bei den Tieren mit Leberresektion bereits nach 2 Tagen Versuchsdauer eine weitgehende Regeneration der Leber stattgefunden hatte. Dies war auch bei den mit 2-ME behandelten Tieren der Fall, was darauf hindeutete, daß die Leberregeneration durch die Anwesenheit von 2-ME nicht beeinträchtigt wurde. Färbungen zum Nachweis von Apoptose zeigten, daß keine Zunahme der Anzahl der apoptotischen Zellen in den mit 2-ME behandelten Gruppen auftrat (Abbildung 34). Braun gefärbte Zellen, die wir als apoptotisch ansahen, waren in erhöhtem Ausmaß nur in der positiven Kontrolle zu erkennen. Alle anderen Gruppen zeigten nur einen geringen Prozentsatz von braun gefärbten Zellen. Auch eine für Apoptose typische Zellmorphologie, wurde nicht beobachtet. Um zu zeigen, daß eine Proliferation der Leber stattgefunden hat, färbten wir die Lebern mit dem Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), was aktiv proliferierende Zellen anfärbt. Proliferierende Zellen fanden sich nur in den Gruppen mit Leberresektion. Dabei war die Färbung unabhängig davon, ob eine Behandlung mit 2-ME stattfand oder nicht. Die Zellmorphologie änderte sich auch nach 2-ME Behandlung nicht. Die beiden Gruppen mit Leberresektion, ohne und mit Behandlung mit 2-ME hingegen wiesen eine deutliche Färbung der Zellkerne auf, was auf eine stattfindende Proliferation hindeutete. Auch hatte die Färbung die gleiche Intensität, ob 2-ME verabreicht wurde oder nicht. Die Mittelwerte der apoptotischen Zellen sind in Abbildung 35 dargestellt. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen. Die Prozentzahlen der aktiv proliferierenden Zellen sind in Abbildung 36 dargestellt. Hier erkennt man eine deutliche Zunahme der proliferierenden Zellen in allen Gruppen mit Leberresektion.



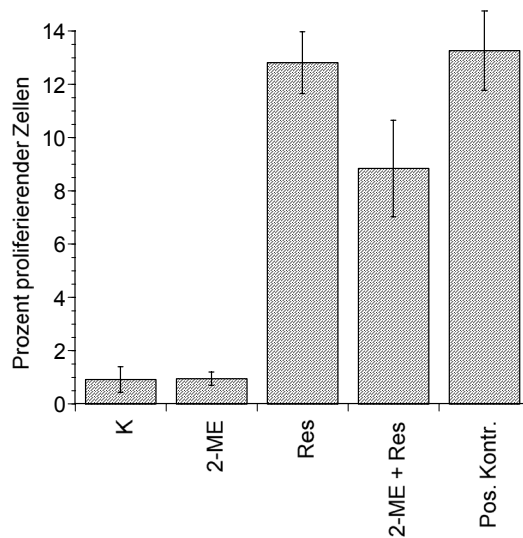
*Abbildung 34*

Representative Photographien von histologischen Schnitten von Mauslebern aus allen Behandlungsgruppen mit TUNEL Färbung auf Apoptose (A, C, E, G, I) und auf Proliferation (PCNA) (B, D, F, H, J). Vergrößerung: 512 fach. Ohne 2-ME und ohne Resektion: A, B; mit 2-ME ohne Resektion: C, D; ohne 2-ME mit Resektion: E, F; mit 2-ME mit Resektion: G, H; positive Kontrollen: I, J. Die Pfeile zeigen apoptotische Zellen.



**Abbildung 35**

Prozentsatz apoptotischer Zellen in der Leber in allen Behandlungsgruppen. Positive Kontrolle: Mit DNase vorbehandelte Lebern. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (System Error of the Mean).



**Abbildung 36**

Prozentsatz der aktiv proliferierenden Zellen in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Steroide und Tumorwachstum**

Östrogene können bekanntermaßen Tumorwachstum, insbesondere des Mamma- und Endometriumkarzinoms fördern, wenn eine chronische Exposition durch hormonelle Dysregulation oder iatrogen vorliegt (Ziehl et al. 1975; Mack et al. 1976; McDonald et al. 1977; Pike et al. 1993; Feigelson et al. 1996). Hierbei hängt die Wachstumsstimulation durch Östrogene und die Prognose der Erkrankung weitgehend von der Expression von Östrogenrezeptoren ab. Therapeutische Strategien bei der Tumorbekämpfung nutzen die Rezeptoren, um den stimulierenden Effekt der Östrogene mit Antagonisten zu blocken (Pritchard et al. 2000; Aebi et al. 2000). Auch bei HCC's kommen vermehrte Östrogenrezeptoren vor, so daß auch diese Tumoren mit Antiöstrogenen behandelt werden, wenn der Östrogenrezeptorstatus als positiv gewertet wird. Jedoch sprechen nicht alle HCC Tumoren auf eine entsprechende Therapie an (Negro et al. 1994). Ganz anders verhält sich 2-ME. Es wirkt nicht tumorfördernd, sondern tumorhemmend bei vielen Tumoren, so daß es deshalb als "a good estrogen" bezeichnet wurde (Pribluda et al. 1998). Die Bindungsstelle ist hierbei nicht der Östrogenrezeptor (Merriam et al. 1980; Seegers et al. 1989; Cushman et al. 1995; Seegers et al. 1997; Wang et al. 2000; LaVallee et al. 2002).

### **5.2. Tumorhemmung durch 2-ME**

Bei den von uns durchgeführten Versuchen konnten wir einen sehr starken, dosisabhängigen, tumorhemmenden Effekt von 2-Methoxyestradiol auf Zellen humaner Tumoren aufzeigen, so des hepatozellulären Karzinoms, des Pankreaskarzinoms und des Bronchialkarzinoms. Gemeinsam haben diese Tumoren eine ausgesprochen schlechte Prognose mit kurzer Überlebensdauer, wenn eine kurative Operation nicht möglich ist. Selbst dann ist die Rezidivrate nach kurzer Zeit sehr hoch und führt schließlich zum Tode des Patienten. 2-ME scheint bei den meisten oder möglicherweise allen malignen Tumoren einen hemmenden Effekt auf das Wachstum zu haben. Das wird auch durch die zunehmende Menge an Publikationen bestätigt (Tabelle 8).

<b>Tumorarten</b>	<b>Autoren</b>	<b>Publikationsjahr</b>
Endothelzellen	Fotsis et al	1994
	Yue et al	1997
	Tsukamoto et al	1998
Osteosarkom	Maran et al.	2002
	Golebiewska et al.	2002
Angiosarkom	Reiser et al	1998
	Arbiser et al	1999
Mammakarzinom	Lottering et al	1992
	Cushman et al	1995
	Klauber et al	1997
	Seegers et al	1998
	Zhu et al	1998
	Zoubine et al	1999
	Amorino et al.	2000
	Lippert et al.	2003
Bronchialkarzinom	Mukhopadhyay et al	1997
	Mukhopadhyay et al	1998
	Kataoka et al	1998
Pankreaskarzinom	Schumacher et al	1999
Hepatozelluläres Karzinom	Schumacher et al	2000
Neuroblastom	Nakagawa-Yagi et al	1996
	Wassberg et al	1999
Magenkarzinom	Heng-Liang et al	2000
	Lin et al.	2001
Multiples Myelom	Dingli et al.	2002
	Chauhan et al.	2002
Prostatakarzinom	Qadan	2001
	Kumar et al.	2001
	Bu et al.	2002
	Figg et al.	2002
Kolorektales Karzinom	Kinuya et al.	2001
	Carothers et al.	2002

Tabelle 8

Literaturübersicht verschiedener Tumore, die durch 2-ME erfolgreich in ihrem Wachstum gehemmt werden konnten.

Im Jahre 2002 hat sich das Tumorspektrum auf Prostata, Osteosarkom, multiples Myelom und auf das kolorektale Karzinom erweitert. Weitere Tumoren wie Ösophaguskarzinom, Gallenwegstumoren, endokrine Tumoren oder andere sind bislang nicht untersucht worden. Die bisherigen Ergebnisse lassen allerdings den Optimismus zu, daß auch diese Tumoren durch 2-ME gehemmt werden können. Besonders häufig wurde das Mammakarzinom untersucht. Die DNA-Synthese und die Mitoserate konnte bei den Mamma-Ca Zellen MCF-7 mit einer geringen Dosis von 10nM gehemmt werden (Lottering et al 1992). Das Tumorwachstum von humanen Mamma-Ca Zellen konnte bei Mäusen um 60% mit einer Dosis von 75mg/kg KG täglich ohne erkennbare Toxizitätszeichen gehemmt werden (Klauber et al. 1997). Zellen humaner Bronchialkarzinome haben sich ebenfalls als sehr empfindlich gegenüber 2-ME gezeigt. Apoptotischer Zelltod wurde beobachtet, wenn die Zellen Wild-Typ p53 exprimierten, welches durch 2-ME stabilisiert wurde (Mukhopadhyay et al. 1997). Als Weiterführung dieser Beobachtung konnten wir zeigen, daß ein Adenovirus, welches den Wild-Typ p53 exprimiert, systemisch in Kombination mit 2-ME appliziert werden konnte. Die beobachtete Stabilisierung und Verlängerung der Halbwertszeit des funktionell aktiven p53 Proteins durch 2-ME bewirkte eine additive Wachstumshemmung von Lungenmetastasen (Kataoka et al. 1998). Dies war der erste Bericht über eine erfolgreiche Tumorchemmung durch ein Tumorsuppressorgen nach systemischer intravenöser Gabe. Eines der größten Probleme der Gentherapie stellt die geringe Expression der transfizierten Gene am Zielort, nämlich in der Tumorzelle dar. Das kann durch die Kombination mit 2-ME positiv beeinflußt werden. Durch die Stabilisierung des p53 Proteins durch 2-ME wurden ausreichende Konzentrationen erreicht, um die Tumorzellen im Wachstum zu hemmen. Auch seltenere Tumoren wie das Neuroblastom (Wassberg et al 1999; Nakagawa-Yagi et al. 1996), das Angiosarkom (Arbiser et al. 1999; Reiser et al. 1998) oder das Osteosarkom (Maran et al. 2002) zeigten eine Tumorchemmung bis zu 84% nach 2-ME Gabe. Im Bereich des Gastrointestinaltraktes gibt es zunehmend Berichte über die Wirksamkeit von 2-ME auf Tumorzellen. So konnten wir mit unseren Untersuchungen als Erstbeschreiber die Wirksamkeit von 2-ME auf Pankreaskarzinome (Schumacher et al. 1999) und auf hepatozelluläre Karzinome (Schumacher et al. 2000; Lin et al. 2000) nachweisen. Für diese Tumoren sind aufgrund ihrer sehr schlechten Prognose neue Therapieoptionen besonders wichtig und von hoher klinischer Bedeutung. Die Wachstumshemmung in vivo erreicht beim

Pankreaskarzinom immerhin 59% (Schumacher et al. 1999). Beim HCC wurde die Hypothese aufgestellt, daß die niedrigere Inzidenz bei Frauen im Vergleich zu Männern durch die physiologischerweise ungleiche Verteilung des 2-ME zugunsten der Frauen erklärbar wird (Lui et al. 2000). Begründet wird diese Beobachtung durch den höheren Östrogenstoffwechsel in der Leber bei Frauen, was zu einer vermehrten Konzentration von Östrogenmetaboliten einschließlich 2-ME in der Leber führt. Weitere gastrointestinale Tumoren wurden später untersucht. Das Magenkarzinom (Heng-Liang et al. 2000; Lin et al. 2001) und das kolorektale Karzinom (Kinuya et al. 2001; Carothers et al. 2002) erwiesen sich als ebenso sensibel auf 2-ME, was zu einer signifikanten Wachstumshemmung führte.

### **5.3. Kombination mit 2-ME und anderen tumorhemmenden Substanzen**

Viele Chemotherapieregime werden in der Klinik mit Kombinationen aus zwei oder mehr Substanzen durchgeführt. Die Vorteile sind eine erhöhte Wirksamkeit bei verringerten Nebenwirkungen. Idealerweise kann es zu einem synergistischen Effekt bei der Tumorkontrolle durch sich ergänzende Wirkmechanismen kommen. Multimodale Therapien bestehend aus Operation und adjuvanter Chemotherapie, oder eine Kombination dieser Therapieverfahren mit Bestrahlung verwenden das Prinzip der sich ergänzenden Wirkungen bei möglichst unterschiedlichen Nebenwirkungen. Eine adjuvante Chemotherapie nach Operation sollte deshalb weniger aggressiv sein als eine alleinige Chemotherapie. Da 2-ME mehrere verschiedene Wirkmechanismen hat, ist es naheliegend, daß aus Kombinationen mit 2-ME bessere therapeutische Wirkungen ohne Zunahme der Toxizität zu erzielen sind. 2-ME ist mit unterschiedlichen Substanzen kombiniert worden. Wir testeten die orale Gabe von 2-ME mit einer intravenösen Gabe von Adenoviren, die p53 exprimierten (Kataoka et al. 1998). Durch den p53 stabilisierenden Effekt von 2-ME konnte eine additive Wachstumshemmung der Lungenmetastasen bewirkt werden. Da der Einsatz von alleinigem Wild-Typ p53 exprimierenden Retroviren bereits klinisch bei Patienten mit Bronchialkarzinomen zu Tumorregress oder stable disease führte (Roth et al. 1996), erscheint die Kombination aus 2-ME und dem p53 exprimierenden Adenovirus eine realistische Alternative zu derzeit etablierten Therapien beim Bronchialkarzinom zu sein. Die Kombination aus p53 exprimierenden

Adenoviren und 2-ME bei Pankreaskarzinomzellen erbrachte keine zusätzliche Wachstumshemmung.

Den p53 stabilisierenden Effekt von 2-ME machte man sich auch zunutze, indem man durch Bestrahlung das p53 in nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen induziert, was der physiologische Mechanismus des p53 zur Zellzykluskontrolle ist, um es dann durch 2-ME zu stabilisieren (Huober et al. 2000). Auch hier konnte eine additive Wachstumshemmung dieser Zellen beobachtet werden. Pankreaskarzinomzellen kombinierten wir mit Substanzen, die im klinischen Einsatz sind. Es konnte mit jedem getesteten Zytostatikum eine additive Wachstumshemmung beobachtet werden. Allerdings ergab sich durch die Kombination keine Zunahme der apoptotischen Zellen über die Wirkung von 2-ME hinaus. Eine synergistische Wachstumshemmung von Endothelzellen (Sweeney et al. 2001) und eine additive Hemmung bei HCC Zellen (Lin et al. 2000) konnte bei der Kombination aus 2-ME und Docetaxel beobachtet werden. Hier scheint der Mechanismus ein Ausschalten des VEGF bedingten Zellschutzes zu sein. Eine Vorbehandlung mit 2-ME und anschließender photodynamischer Therapie zeigte, daß die 2-ME bedingte Hemmung der SOD (Superoxid Dismutasen) zu einem synergistischen Effekt in der Tumorzellhemmung führt (Golab et al. 2003). Dadurch verlieren die Zellen den SOD bedingten Rescuemechanismus und sterben ab. Nachdem 2-ME mit einer Vielzahl von Substanzen in vitro kombiniert wurde, was jeweils zu einem additiven oder synergistischen Effekt in der Tumorkontrolle führte, werden bei der klinischen Anwendung nach den ersten Studien voraussichtlich verschiedene Kombinationen angewendet werden. Da die Nebenwirkungen von 2-ME sehr gering zu sein scheinen, sind auch höhere und damit unter Umständen wirksamere Dosen von 2-ME vorstellbar. Entscheidend ist, daß Kombinationen von Zytostatika und 2-ME eine deutlich bessere Tumorchemmung zeigen ohne Zunahme der Toxizität. Das wird in der klinischen Behandlung, selbst bei nur additiver Wirkung, noch mehr aber bei synergistischer Wirkung, insbesondere bei Tumoren wie Pankreas-, Bronchial- und Leberkarzinomen fast einem Durchbruch gleichen.



## 5.4. Wirkmechanismen von 2-ME auf Tumorzellen

### 5.4.1. Antiangiogenetischer Effekt

Wiederholt wurde berichtet, daß 2-ME einen starken antiangiogenetischen Effekt aufweist. Da die Angiogenese für das Tumorwachstum entscheidend ist, bewirkt die Antiangiogenese eine Hemmung des Tumorwachstums durch Entzug von Nährstoffen. Ein erster Bericht in diesem Zusammenhang zeigte eine Hemmung der Endothelproliferation nach Behandlung mit 2-ME. Desweiteren wurde eine starke Hemmung der Neovaskularisierung mit einer daraus hervorgehenden Wachstumshemmung von Tumoren beobachtet (Fotsis et al. 1994). Andere Autoren konnten den hemmenden Effekt auf die Proliferation mit Induktion von Apoptose bei Endothelzellen bestätigen (Yue et al. 1997; Tsukamoto et al. 1998). Auf der Basis dieser Beobachtungen war es keine Überraschung, daß Angiotumorzellen, die von Endothelzellen stammen, durch 2-ME signifikant in ihrem Wachstum gehemmt werden konnten (Reiser et al. 1998). Die durch VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) induzierte Neovaskularisierung der Kornea konnte um 54% gehemmt werden (Klauber et al. 1997). Eine Herabregulation von VEGF mit einer anschließenden Hemmung der Tumorangiogenese um 89% konnte in Prolaktin-sezernierenden Hypophysentumoren der Ratte analog dazu gezeigt werden (Banerjee et al. 2000). Bei Kolonkarzinomen am Mausmodell fand man, daß die Tumorchemmung durch die Kombination aus Radioimmuntherapie und 2-ME über einen Mechanismus der Antiangiogenese durch 2-ME zustande kam (Kinuya et al. 2001). Auch bei nicht malignen Erkrankungen wie der chorioidalen Neovaskularisierung kann 2-ME im Rattenmodell eine deutliche Hemmung der Neovaskularisierung bewirken (Robinson et al. 2002). Ferner werden glomeruläre Mesangiumzellen in der Proliferation gehemmt (Dubey et al. 2002). Unsere Ergebnisse konnten diese häufig beschriebenen antiangiogenetischen Effekte nicht reproduzieren. Am Lungenmetastasenmodell mit Pankreaskarzinomzellen konnte zwar eine geringere Anzahl der Blutgefäße in der mit 2-ME behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden, jedoch waren die Daten nicht statistisch signifikant (Schumacher et al. 1999). Auch bei den Lungenmetastasen der Bronchialkarzinomzelllinie A549 konnten wir keine Reduktion der Blutgefäße nach Behandlung mit 2-ME feststellen (Kataoka et al. 1998). Bei den HCC Tumoren haben wir das Phänomen der Angiogenese nicht

untersucht (Schumacher et al. 2000). Die Ursache für die fehlende Hemmung der Angiogenese beim Pankreas- und Bronchialkarzinom ist zunächst unklar.

#### 5.4.2. Hemmung der Mikrotubuli

In manchen Systemen konnte durch 2-ME eine Hemmung der Tubulinpolymerisation durch eine Interaktion an der Colchicinbindungsstelle durch kompetitive Bindung von 2-ME an Tubulin beobachtet werden (D'Amato et al. 1994, Cushman et al. 1995). Modifikationen der molekularen Struktur von 2-ME wurden vorgenommen, so daß ein neuer Inhibitor der Tubulinpolymerisation mit ähnlichen Eigenschaften wie Paclitaxel entstanden ist (Verdier-Pinard et al. 2000). Die Acetylgruppe an C17 war für diesen Effekt verantwortlich. Die Interaktion mit Tubulin scheint sich mit unpolymerisiertem Tubulin und mit Tubulin Polymeren zu ereignen (Hamel et al. 1996). Neben der Hemmung der Tubulinpolymerisation wurde auch ein Zellzyklusarrest ohne Depolymerisation von Tubulin beobachtet. In Leukämiezellen konnte man zeigen, daß 2-ME einen hemmenden Effekt auf die Fähigkeit von Calmodulin besitzt, die Phosphodiesterase zu aktivieren, was zu einem funktionell inaktiven Mitoseapparat führt, in dem die Chromosomen in der Äquatorialebene verharren (Attalla et al. 1996).

#### 5.4.3. Induktion von Apoptose und molekulare Veränderungen

Der Prozess des apoptotischen Zelltodes ist ein essentieller Teil der physiologischen Gewebshomöostase und der Tumorzellkontrolle. Tumorzellen, die der physiologischen Kontrolle entgehen, entwickeln einen Tumor. Der Verlust der Apoptosekapazität z.B. durch eine Mutation von Tumorsuppressorgenen kann durch verschiedene therapeutische Maßnahmen wiederhergestellt werden (Kliche et al. 1999). Die Induktion der Apoptose kann durch Therapie mit 2-ME bewirkt werden, wie in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden konnte. Neuroblastomzellen erlitten bereits nach 10nM 2-ME den apoptotischen Zelltod (Nakagawa-Yagi et al. 1996). Weitere Zelltypen wie Prostatakarzinomzellen (Qadan et al. 2001; Bu et al. 2002), Mammakarzinomzellen (LaVallee et al. 2000), Leukämiezellen (Huang et al. 2000), Magenkarzinomzellen (Lin et al. 2001), Osteosarkomzellen (Maran et al. 2002) und andere folgten, die durch 2-ME in den apoptotischen Zelltod überführt werden. Unterschiedliche Mechanismen kommen dabei offenbar zum Tragen.

#### 5.4.4. Einfluß des p53

2-ME hat die Eigenschaft, das funktionell aktive p53 Protein zu stabilisieren, was zu einer verlängerten Halbwertszeit und damit zu einer gewissen Akkumulation in der Zelle führt (Mukhopadhyay et al 1997). Das wiederum bewirkt eine Zellzykluskontrolle durch G1-Arrest im Zellzyklus oder durch Induktion der Apoptose. Diese durch 2-ME induzierte p53 Expression ist ein physiologischer Mechanismus des p53. Bei stark geschädigter Zelle, z.B. durch Bestrahlung, kommt es durch p53 zum apoptotischen Zelltod. Ein Arrest in der G1-Phase durch p53 tritt bei weniger stark geschädigter Zelle ein, um den Reparaturmechanismen genügend Zeit zu geben, den Defekt zu beheben, bevor eine Entartung stattfindet. Ein p53 abhängiger Mechanismus konnte auch bei Lymphoblastomzelllinien beobachtet werden. Hierbei kam es nicht zu einer Akkumulation des p53 Proteins, sondern zu einer Freisetzung des p53 Proteins vom T-Antigen (Seegers et al. 1997). Bei Wild-Typ p53 exprimierenden Tumorzellen wurde 2-ME als Verstärker bei der Bestrahlung von Bronchialkarzinomzellen verwendet, wobei man sich den p53 stabilisierenden Effekt zunutze machte (Amorino et al. 2000; Huober et al. 2000). Nach der Induktion des p53 Proteins kam es durch 2-ME zu einer Stabilisierung und wiederum zu einer Akkumulation des p53 Proteins mit nachfolgend vermehrter Tumorchemmung. Dasselbe Phänomen der p53 Stabilisierung wurde in einem Folgeprojekt benutzt. Es wurden Bronchialkarzinomzellen mit einem Wild-Typ p53 tragenden Adenovirus (Ad-p53) transfiziert, um 2 Tage darauf 2-ME zu verabreichen, was wiederum das p53 stabilisierte und zu vermehrter Apoptose im Vergleich zur Behandlung mit den einzelnen Komponenten führte (Mukhopadhyay et al. 1998). Wiederum in einem Folgeprojekt an einem Metastasenmodell in der Maus mit Bronchialkarzinomzellen konnten wir zeigen, daß die Kombination aus intravenös verabreichtem Ad-p53 und oral appliziertem 2-ME eine additive Hemmung der Wachstumsrate der Metastasen bewirkte wie bereits im Abschnitt „Tumorchemmung durch 2-ME“ beschrieben. In einer späteren Untersuchung konnte auch bei kolorektalen Karzinomzellen die p53 abhängige Apoptose beobachtet werden (Carothers et al 2002). Ob hier ebenfalls eine Stabilisierung des p53 Proteins stattfindet, wurde nicht untersucht. Bei der Induktion der Apoptose durch p53 Stabilisierung findet möglicherweise auch eine Phosphorylierung des Phosphoproteins p53 statt, an der verschiedene Kinasen beteiligt sein können. Die beiden Hauptlokalisationen einer Phosphorylierung sind das N- und C-terminale Ende des Proteins, wobei das N-Ende die

transkriptionsregulierende Domäne und das C-Ende die spezifische Bindung von p53 an die DNA kontrolliert (Steegenga et al. 1996). Bei unseren Versuchen mit den Wild-Typ p53 exprimierenden HCC Zellen SK-Hep 1 und Hep G2 kam es zu einer starken (bei SK-Hep 1 Zellen) bzw. schwachen (bei Hep G2 Zellen) Hochregulation des p53 Proteins. Auch das p53 abhängige P21<sup>WAF1</sup> Protein wurde als Zeichen eines funktionell aktiven p53 Proteins dementsprechend heraufreguliert. Die unterschiedliche Sensibilität dieser beiden Zelllinien hängt vermutlich, zumindest partiell, mit der p53 Expression zusammen.

In unseren hier beschriebenen Versuchen an Pankreaskarzinomzellen zeigten wir erstmals, daß die Induktion der Apoptose auch p53 unabhängig ablaufen kann. Bei Verwendung von Zelllinien, die alle eine Mutation für das p53 Gen aufwiesen, konnten wir eine starke Induktion von Apoptose beobachten. Um zu erhärten, daß es sich um ein funktionell inaktives p53 Protein handelte, führten wir Western Blot Untersuchungen durch, um die Expression des direkten abhängigen Effektorproteins, p21<sup>WAF1</sup> zu untersuchen. Hier war keine Induktion zu erkennen, was bei funktionell aktivem p53 Protein zu erwarten gewesen wäre. Trotz der p53 Mutation war auch hier in vivo eine starke Tumorchemmung mit 59% gegenüber der Kontrollgruppe erkennbar gewesen (Schumacher et al. 1999).

#### 5.4.5. Einfluß des bcl-2

bcl-2, das stärkste antiapoptotische Gen, wird durch 2-ME in einer Weise beeinflusst, daß die Induktion der Apoptose gefördert wird. Die bcl-2 Familie ist eine Gruppe von pro- und antiapoptotischen Genen, die durch Wechselwirkungen sowie Bildung von Di- und Tetrameren den Zellzyklus und die Apoptoserate beeinflussen. Eine Gruppe berichtete über eine Heraufregulation von bcl-2 und Fas nach Inkubation von Endothelzellen mit 2-ME. Induktion von Apoptose und Hemmung der Angiogenese wurde beobachtet. Eine Korrelation zwischen bcl-2 und Fas konnte nicht festgestellt werden, und eine Erklärung der bcl-2 Heraufregulation konnte ebenfalls nicht gefunden werden (Yue et al. 1997). 2-ME kann bcl-2 phosphorylieren, was zu einer Inaktivierung von bcl-2 führt, was wiederum eine Förderung der Apoptoseinduktion zur Folge hat. Die Phosphorylierung scheint nicht direkt zu sein, sondern über einen Mechanismus der Heraufregulation der Kinase JNK/SAPK, die in die Inaktivierung von bcl-2 involviert zu sein scheint, abzulaufen (Attalla et al. 1998). Eine weitere Gruppe konnte zeigen, daß eine Phosphorylierung von bcl-2 mit anschließender

Inaktivierung durch 2-ME ausgelöst wird (Budhram-Mahadeo et al. 1999). Bei Pankreaskarzinomzellen fand man, daß ein antiapoptotisches Mitglied aus der bcl-2 Familie, das bcl-x(L) durch 2-ME phosphoryliert und somit inaktiviert wird. Daraus entsteht wiederum eine Förderung der Apoptoseinduktion (Qanungo et al. 2002). In unseren Untersuchungen beobachteten wir, daß bei den HCC Zellen SK-Hep 1 nach Behandlung mit 1,5µM 2-ME die bcl-2 Expression um das sechsfache reduziert wurde. Die charakteristische Doppelbande, den Bandenshift, der bei phosphoryliertem bcl-2 auftritt, beobachteten wir nicht. Somit scheint ein weiterer, bislang nicht beschriebener Mechanismus der bcl-2 Inaktivierung vorzuliegen. Es kann entweder zu einer direkten Wirkung auf DNA-Ebene zur Hemmung der bcl-2 Synthese oder zu einem verstärkten Abbau des bcl-2 Proteins mit der Folge einer verkürzten Halbwertszeit auf Proteinebene kommen. Möglicherweise hat p53 eine direkte oder indirekte Wirkung auf die bcl-2 Expression. So kann bcl-2 das Eindringen von p53 in den Zellkern verhindern (Beham et al. 1997). Eine Überexpression von bcl-2 verhindert die Apoptoseinduktion durch p53, wie wir in einem Versuch mit p53 exprimierenden Adenoviren an bcl-2 überexprimierenden Prostatakarzinomzellen zeigen konnten (Schumacher et al. 2001). Eine durch p53 bedingte Hemmung des bcl-2 Promotors und damit die Inhibition der Transkription von bcl-2 kommt vor und könnte in unserem System der Mechanismus der bcl-2 Reduktion sein (Budhram-Mahadeo et al. 1999). In dieser Kombination einer Hochregulation von apoptotisch wirkendem p53-Protein einerseits und einer verminderten Expression von antiapoptotisch wirkendem bcl-2 Protein andererseits könnte die Ursache der besonders stark ausgeprägten Sensibilität gegenüber 2-ME der Zelllinie Sk-Hep 1 liegen. Auch andere Tumorzellen von Kopf- und Halskarzinomen zeigten nach einer Behandlung mit verschiedenen Zytostatika eine Veränderung in ihrem bcl-2/bax-Status. Nach Gabe von Paclitaxel kam es ebenfalls zu einer Abnahme der bcl-2-Expression in den behandelten Zellen (Kawakami et al. 1999). Somit scheint ein Wirkmechanismus verschiedener Zytostatika, wie auch bei 2-ME, in einer Verminderung der Expression von bcl-2 zu bestehen und damit Apoptose zu ermöglichen. Bei den anderen Zelllinien in unseren Untersuchungen zeigte sich keine signifikante Abnahme der bcl-2-Spiegel in den Zellen. Bei den für p53 mutierten Zelllinien PLC/PRF/5 und Hep 3B läßt sich dies damit erklären, daß das in diesen Zellen gebildete transkriptionell nicht-funktionelle p53-Protein bzw. fehlendes p53 nicht in der Lage ist an die DNA zu binden und damit den Promotor zu

beeinflussen (Budhram-Mahadeo et al. 1999). Die Wild-Typ p53 exprimierende Zelllinie Hep G2 zeigte nur geringfügig erhöhte p53-Mengen in der Zelle, die scheinbar nicht ausreichend erhöht waren, um Einfluß auf die bcl-2-Expression zu nehmen.

#### 5.4.6. Zellzyklusarrest

Neben den beschriebenen Wirkmechanismen und Veränderungen kann auch ein Zellzyklusarrest durch 2-ME induziert werden. Eine Hochregulation von p21<sup>WAF1</sup> bewirkt eine Wachstumshemmung der Zelle durch einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>/M-Phase und verhindert dadurch die Induktion der Apoptose (Chen et al. 1996). Ist jedoch gleichzeitig eine Überexpression von p53 vorhanden, kann das diesen zellzyklus-arretierenden Effekt des p21<sup>WAF1</sup> aufheben (Kagawa et al. 1997), und es entstehen apoptotische Zellen in der sub-G<sub>1</sub>-Region. Dieser Effekt scheint auch bei unseren Untersuchungen an den Zellen hepatozellulärer Karzinome zu existieren, da vor allem bei Zellen der Zelllinie Sk-Hep 1 nach Behandlung mit 2-ME sowohl hohe Level von p21<sup>WAF1</sup> als auch von p53 exprimiert wurden. Veränderungen in den G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>/M-Phasen wurden hier trotz der p21<sup>WAF1</sup> Überexpression nicht beobachtet, wohl aber eine Apoptoseinduktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung, daß p53 den Effekt von p21<sup>WAF1</sup> überrollen kann. Bei einer Studie an Schilddrüsenzellen wurde ein Zellzyklusarrest der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase als Ursache einer Proliferationshemmung nach Behandlung mit 2-ME beobachtet. Erst nach einer längeren Exposition der Zellen gegenüber 2-ME wurde eine Apoptose-Induktion sowie die Freisetzung von Autoantigen gefunden (Wang et al. 2000). Auch bei der Hemmung der Mikrotubuli-Formation der mitotischen Spindel kommt es zu einem Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase (D'Amato et al. 1994). Wir konnten in unseren Untersuchungen eine zeitabhängige Apoptoseinduktion nach 2-ME Behandlung gegenüber den Kontrollgruppen beobachten. Allerdings konnten wir 48 Stunden nach der 2-ME Gabe und nachdem morphologisch sichtbare Zellveränderungen, die auf eine Apoptose hinweisen, auftraten, keinen signifikanten Arrest der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase feststellen. Es ist jedoch möglich, daß nach der Behandlung und vor dem Auftreten charakteristischer morphologischer Apoptosezeichen der Zellen und damit der Apoptose-Induktion ein sehr kurzzeitiger Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase besteht. In einer weiteren Studie über den Wirkmechanismus von 2-ME auf HCC-Zellen wurde ebenfalls ein Arrest der

Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase, der über eine Induktion von Apoptose zu einer Wachstumsinhibition führte, gefunden (Lin et al. 2000).

#### 5.4.7. Andere Mechanismen

Als weiterer Mechanismus wurde beschrieben, daß die Expression von p34cdc2 und Cyclin B1, beide in den Prozess des Zellzyklus involviert, durch 2-ME in MCF-7 Mammakarzinomzellen vermindert wird, was zu einer verstärkten Apoptoserate in diesen Zellen führte (Zoubine et al. 1999). 2-ME kann auch den intrazellulären Gehalt der Nitric Oxid Synthase (NOS) und die Produktion von Stickstoffmonooxid (NO) erhöhen. Weiterhin verändert 2-ME die Membranlokalisation von NOS. Diese Mechanismen führten ebenfalls zu einer verstärkten Apoptoseinduktion in vaskulären Endothelzellen (Tsukamoto et al. 1998).

Die beschriebenen Mechanismen der Wachstumshemmung verschiedener Zellen kommen vermutlich in mehr oder weniger ausgeprägtem Ausmaß in allen Zelltypen vor. Die Induktion von Apoptose scheint hierbei der wichtigste Effekt zu sein. Unterschiedliche Faktoren innerhalb der Zellen führen dabei die Zellen zu einem gemeinsamen Endpunkt, der Apoptosekaskade. Das wäre der Idealfall in der klinischen Behandlung, da ein Zellzyklusarrest auch nur temporär sein kann und so der Zelle die Möglichkeit gibt, sich nach einer gewissen Zeit wieder zu vermehren und möglicherweise auch eine Resistenz gegen 2-ME ausbildet. Die anderen Mechanismen greifen scheinbar, wenn die Zellen eine geringere Menge 2-ME erhalten. Welcher Mechanismus in vivo letztendlich der wichtigste ist, ist noch unklar. Vermutlich kommen mehrere Mechanismen mehr oder weniger stark zum Tragen. Ergebnisse von Versuchen an immunsupprimierten Tieren, die in der Regel bei den Tierversuchen eingesetzt werden, sind nur bedingt in die Klinik übertragbar, da auch ein intaktes Immunsystem eine Wirkung auf 2-ME selbst haben könnte.

### 5.5. Chemoresistenz und 2-ME

Trotz der scheinbar generellen Wachstumshemmung durch 2-ME, wenn auch mit verschiedenen Wirkmechanismen, gibt es doch vereinzelt Zellen, die weniger gut auf 2-ME ansprechen. Diese Beobachtung wurde beim Pankreaskarzinom gemacht, von dem zwei Zelllinien mit einer gewissen Resistenz gefunden wurden (Schumacher et al. 1999; Qanungo et al. 2002). Besonders interessant an unserer Beobachtung ist,

daß wir zwei Zelllinien verwendeten, die aus einem Tumor isoliert wurden. Davon ist die PaTu 8988t hochgradig sensibel auf 2-ME und reagiert mit raschem apoptotischen Zelltod, die Schwesternzelllinie PaTu 8988s hingegen erfährt zwar einen gewissen G1-Arrest im Zellzyklus nach hohen Dosen 2-ME, eine erhöhte Apoptoserate konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Ursache dieser relativen Resistenz bleibt unklar und sollte weiter untersucht werden. Möglich wäre das Vorliegen genetischer Varianten der COMT (Catechol-O-methyltransferase), einem Enzym, welches das Entstehen von Methoxyöstrogenen wie 2-ME katalysiert. Bestimmte Isoformen tragen dazu bei, daß weniger Methoxyöstrogene gebildet werden (Dawling et al. 2001). Ob Tumorzellen nach kontinuierlicher Behandlung mit 2-ME eine Resistenz gegen 2-ME ausbilden, ist nicht bekannt und sollte untersucht werden.

Auf der anderen Seite konnten wir und andere zeigen, daß multiresistente Tumorzellen gegen viele Zytostatika ausgesprochen sensibel gegenüber 2-ME sind. Die  $IC_{50}$  lag bei den resistenten Pankreaskarzinomzellen bei  $1,65\mu M$ , was in etwa dem der sensiblen Zellen entspricht. Auch hier konnte der Mechanismus noch nicht ausreichend geklärt werden. Auch die cisplatinresistenten H1299 Zellen von einem Bronchialkarzinom zeigten in unseren Untersuchungen komplette Sensibilität gegenüber 2-ME, die zusätzlich in Kombination mit dem p53 tragenden Adenovirus (Ad-p53) eine additive Wachstumshemmung ergab. In einer anderen Arbeit konnten ähnliche Ergebnisse beim multiplen Myelom beobachtet werden (Chauhan et al. 2002). Hier wurde als Mechanismus der Wachstumshemmung eine Induktion von Apoptose gefunden, die über Cytochrom C Release und Aktivierung der Caspasen 8, 9 und 3 erfolgte. Die Ursache der Überwindung der Resistenz konnte auch hier nicht abschließend gefunden werden. Die Erkenntnis der Überwindung der Resistenz ist von außerordentlicher klinischer Bedeutung, da sehr viele Tumoren chemoresistent werden und somit einer weiteren Therapie nicht zugänglich sind, wie es häufig bei Rezidivtumoren vorkommt. Sowohl unsere Daten als auch die Ergebnisse beim multiplen Myelom zeigen, daß 2-ME in keiner Weise durch die Resistenz gegenüber den herkömmlichen Zytostatika beeinflusst wird. Die Expression des Resistenzgens *mdr-1* scheint für 2-ME bei den Pankreaskarzinomzellen keine wesentliche Bedeutung zu haben, da derselbe Zellklon mit oder ohne Expression des *mdr-1* Gens gleichermaßen sensibel war.



## **5.6. Wirksamkeit von 2-ME in vivo und Einschätzung der Toxizität**

Mit 2-ME wurden viele Tierversuche mit unterschiedlichen Tumorarten durchgeführt. Die Rate der Tumorthemmung wird meist in einem Bereich zwischen 45 und 60% angegeben (Fotsis et al. 1994; Klauber et al. 1997; Kataoka et al. 1998; Schumacher et al. 1999; Schumacher et al. 2000). Deutlich erkennbare Nebenwirkungen wie Durchfall, Verweigerung der Nahrungsaufnahme, Bewegungsarmut oder Gewichtsverlust konnte in keiner dieser Untersuchungen beobachtet werden. Bei unseren Versuchen mit Pankreaskarzinomzellen konnten wir bei den Tierversuchen in der Kontrollgruppe eine deutliche Tumorkachexie mit 20% weniger durchschnittlichem Körpergewicht gegenüber der mit 2-ME behandelten Gruppe feststellen. Eine Toxizitätsstudie bei Ratten und Hunden ergab, daß nur bei sehr hohen Dosen von 300mg/kg KG 2-ME täglich für 29 Tage geringe Veränderungen der Leberwerte AST, ALT und GGT sowie ein Anstieg der Gallensäuren auftraten (McCormick et al. 2000). Histopathologische Veränderungen wurden in der Leber und Geweben der Geschlechtsorgane beobachtet. Dosen von 90mg/kg KG 2-ME erzeugten bei Beaglehunden keine evidente Toxizität oder Veränderungen der klinischen Merkmale oder der Laborparameter. Nach einer dreiwöchigen Behandlung mit höheren Dosen bis zu 160mg/kg KG 2-ME wurde sowohl bei Ratten als auch bei Hunden eine Größenreduktion von Testes und Uteri beobachtet. In unseren Versuchen mit der Behandlung von Mäusen nach Leberresektion fanden wir keine klinisch apparenten Nebenwirkungen durch 2-ME, trotz stark regenerierender Hepatozyten. Somit scheint die Toxizität auf die Leber, speziell im Resektionsfall, ebenfalls nicht oder nur sehr gering ausgeprägt zu sein. Bei hemmender Wirkung auf alle proliferierenden Zellen müsste es demnach zu einer Hemmung der Leberregeneration kommen, was wir jedoch nicht beobachtet haben.

## **5.7. Tumorspezifität von 2-ME**

Wenn bei den in vitro Untersuchungen Zellen aus normalen, nicht tumorös veränderten Geweben, als Kontrollgruppe verwendet wurden, handelte es sich stets um Zellen, die keinerlei Proliferationstendenz zeigten (Mukhopadhyay et al. 1997; Schumacher et al. 2000). Wir untersuchten frische normale humane Hepatozyten, die sich nach Leberresektion in Kultur befanden, nach Behandlung mit 2-ME auf mögliche Zellschädigungen. Dabei wurden die Zellen mit Dosen bis zu 10µM 2-ME

behandelt, eine bis zu 5-fache Dosis, die in den Karzinomzelllinien bereits zur Apoptose der Zellen führte. Es zeigten sich jedoch sowohl in den Nativaufnahmen als auch in den Fluoreszenzfärbungen morphologisch keine Zellschädigungen oder Hinweise auf eine verstärkt ablaufende Apoptose der mit 2-ME behandelten Zellen. Zwar konnte man erkennen, daß die Hepatozyten keine Toxizitätszeichen nach Behandlung mit 2-ME zeigten, jedoch erschien uns dieser Versuch noch nicht aufschlußreich genug, um eine klinische Situation ausreichend zu imitieren. Die meisten tumorhemmenden Substanzen greifen in den Zellzyklus ein und töten somit proliferierende Zellen. Daher muß ein System mit proliferierenden gesunden Zellen untersucht werden. Wir verwendeten dazu ein Tiermodell an der Maus mit Leberresektionen, wonach es zu einem starken Proliferationsreiz der Hepatozyten kommt (Peters et al. 2000). Nach Behandlung mit 2-ME konnte auch bei diesem Versuch in der regenerierenden Leber kein Hinweis auf vermehrte Apoptose durch 2-ME gefunden werden, so daß von einer Tumorspezifität ausgegangen werden kann. Diese Ergebnisse sind von erheblichem klinischen Interesse, da 2-ME gerade beim HCC nach Leberresektion ohne Beeinflussung der Leberregeneration eingesetzt werden könnte. In einer Untersuchung an zwei Lymphoblastzelllinien und normalen Hautfibroblasten, die alle vom selben Spender abstammten, konnte gezeigt werden, daß die Lymphoblastzelllinien apoptotischen Zelltod erlitten. Gleichzeitig blieben die normalen Hautfibroblasten durch 2-ME unbeeinflusst (Seegers et al. 1997). Diese Beobachtungen deuteten ebenfalls auf eine gewisse Tumorspezifität von 2-ME hin. Untermuert wird diese These der Tumorspezifität durch eine Untersuchung an Leukämiezellen, die durch 2-ME apoptotischen Zelltod erlitten. Normale Lymphozyten hingegen blieben unberührt durch 2-ME. Als Zielstruktur für 2-ME wurden in diesem System die Superoxid Dismutasen (SOD) identifiziert (Huang et al. 2000). SOD sind essentielle Enzyme, die Superoxidradikale ( $O_2^{\cdot-}$ ) eliminieren, was die Zellen vor dem Schaden durch freie Radikale schützt. Die aktive  $O_2^{\cdot-}$  Produktion und die geringe SOD Aktivität in Tumorzellen könnte diese Zellen für das Überleben stark von den SOD abhängig und empfindlich für eine Hemmung der SOD machen. Wenn 2-ME die SOD hemmt, kommt es somit zu einer tumorspezifischen Proliferationshemmung oder Induktion von Apoptose. Weitere Hinweise auf eine gewisse Tumorspezifität werden durch die Beobachtung bestärkt, daß keine evidenten Nebenwirkungen schnell proliferierender Gewebe wie Darmmukosa oder

Knochenmark bei therapeutischen Dosen auftreten, was sich in Durchfall oder einer Knochenmarkdepression niederschlagen müßte.

### **5.8. Potentielles Risiko durch 2-ME**

Ein kürzlich erschienener Bericht zeigte eine mögliche Karzinogenität durch 2-ME, die in embryonalen Fibroblasten von syrischen Hamstern beobachtet wurde. Es wurden hauptsächlich Veränderungen der Chromosomen entdeckt, wie Aberrationen, Brüche, Austausch und Chromosomenpulverisationen. Außerdem scheinen diverse Polyploidien aufzutreten. Damit scheint 2-ME zelltransformierend sowie genotoxisch auf kultivierte embryonale Säugetierzellen zu wirken und somit besteht die theoretische Gefahr einer Fruchtschädigung in vivo (Tsutsui et al. 2000). Dieser Effekt wurde bislang jedoch nur in diesem speziellen System beobachtet. Auch die geringen Nebenwirkungen auf die Geschlechtsorgane als nahezu einziges Organsystem (McCormick et al. 2000) deuten in diese Richtung. Deshalb sollte man schwangere Frauen bei den klinischen Versuchen auf jeden Fall ausschließen. In einer weiteren Studie wurde das Knochenwachstum junger weiblicher Ratten nach Gabe von 2-ME beobachtet. 2-ME scheint das Längenwachstum der Knochen deutlich zu reduzieren, während das radiale Wachstum sowie der Knorpel/Knochen-Übergang davon unbeeinträchtigt blieben. Dies zeigte eine weitere Eigenschaft von 2-ME, nämlich zwischen verschiedenen Geweben unterscheiden zu können (Turner et al. 2000). Ein möglicher Mechanismus hierbei könnte die Hemmung der Angiogenese sein. Auch dieser Effekt auf das Knochenwachstum muss vor einer möglichen späteren Anwendung am Menschen genauer untersucht werden.

### **5.9. Klinischer Einsatz von 2-ME**

Nach den präklinischen Untersuchungen wurde 2-ME in klinischen Studien bei verschiedenen Tumoren eingesetzt. Bislang wurden klinische Studien nur in Kliniken der USA durchgeführt, da 2-ME unter dem Namen Panzem<sup>TM</sup> durch die US amerikanische Firma EntreMed vertrieben wird. Tabelle 9 zeigt eine Übersicht der derzeit laufenden klinischen Studien.

Ort der Studie	Tumortyp	Phase
Mayo Clinic, Rochester, MN	Multiples Myelom	II
Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA		
National Cancer Institute, Bethesda, MD	Fortgeschrittene solide Tumoren	I
Mayo Clinic, Rochester, MN	Fortgeschrittene solide Tumoren	I
IndianaUniversityCancerCenter, Indianapolis, IN	Metastasierendes Mamma-Ca	I
University of Wisconsin, Madison, WI	Prostata-Ca	II
Indiana University Cancer Center, Indianapolis, IN		

Tabelle 9

Kliniken der USA, in denen derzeit klinische Phase I oder Phase II Studien mit 2-ME durchgeführt werden.

#### 5.9.1. Phase I Studie beim metastasierenden Mammakarzinom

Die erste Phase I Studie beim metastasierenden Mammakarzinom wurde beim Jahreskongress 2002 der American Association of Clinical Oncology (ASCO) vorgestellt (Sledge et al. 2002). Es wurden Patientinnen mit vorbehandeltem metastasierenden Mammakarzinom behandelt. 2-ME wurde oral einmal (200–1000mg/Tag) oder zweimal täglich (200–800mg/12h) verabreicht. Die Behandlungsdauer betrug 28 Tage, gefolgt von einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Patientinnen mit einer Response oder stable disease führten die Behandlung bis zum Tumorprogress fort. Die maximal tolerierte Dosis (MTD) basierte auf der beobachteten Toxizität während der ersten 28 Behandlungstage. 31 Patientinnen mit einem Karnowsky Index von über 80 wurden in die Studie aufgenommen. Das mediane Alter lag bei 48 Jahren (Range 30-70). 22 Patientinnen hatten insbesondere eine viszerale Tumormanifestation. Patientinnen mit ZNS Beteiligung wurden von der Studie ausgeschlossen. Alle Patientinnen hatten zuvor Chemotherapie bei fortgeschrittenem Leiden erhalten. Davon hatten 13 Patientinnen eine Hochdosistherapie mit Stammzellen erhalten. Es wurden keine Veränderungen der Östrogenspiegel, des LH oder des FSH beobachtet. Die maximalen Serumspiegel von 2-ME wurden 2-4 Stunden nach Applikation gemessen. Die Halbwertszeit von 2-ME lag bei ca. 10 Stunden. Eine Akkumulation von 2-ME wurde nicht bei der einmaligen täglichen Gabe, jedoch in den ersten Tagen bei der täglichen

zweimaligen Gabe beobachtet. Man fand eine hohe interindividuelle Variabilität des 2-ME Metabolismus zu 2-Methoxyestron (2-ME1) mit sehr hohen 2-ME1-Spiegeln. 17 Patientinnen zeigten stable disease nach der ersten Therapiephase und im weiteren Verlauf. Die mediane Therapiedauer betrug 41 Tage (Range 13-258). 2-ME wurde gut vertragen und veränderte nicht den Hormonstatus der behandelten Patientinnen.

#### 5.9.2. Phase I Studie beim metastasierenden Mammakarzinom in Kombination mit Docetaxel

Die ersten Ergebnisse ermutigten, eine weitere Studie, mit einer Kombination aus 2-ME und Docetaxel als Phase I Studie, ebenfalls beim metastasierenden Mammakarzinom an der Indiana Universität in Indianapolis anzuschließen (Miller et al. 2002). Es sollten primär Sicherheit, Toxizität und Pharmakokinetik untersucht werden. Als sekundäre Parameter sollten Veränderungen der Angiogenese, Hormonveränderungen und die Tumorresponse berücksichtigt werden.

##### 5.9.2.1. Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patientinnen mit Lokalrezidiv oder Fernmetastasen von Mammakarzinomen.

Nicht mehr als ein Taxanhaltiges Regime durfte zuvor verabreicht worden sein. Adjuvante taxanhaltige Chemotherapie in der Vorgeschichte war erlaubt, wenn mehr als 12 Monate zurücklagen.

Das ZNS durfte nicht befallen sein, und die Organfunktionen mußten gut sein.

##### 5.9.2.2. Behandlung mit Dosisescalationsschema (Abbildung 37)

Verabreicht wurde Docetaxel  $35\text{mg/m}^2$  Körperoberfläche wöchentlich in 4 von 6 Wochen, 2-ME oral einmal täglich mit einer Eskalation (200, 400, 600, 800, 1000 mg).

Ein Zyklus dauerte 6 Wochen

Die Dauer für die Kombinationsbehandlung betrug maximal 6 Zyklen

Responder oder Patienten mit stable disease werden weiter behandelt, bis eine Tumorprogression auftritt.

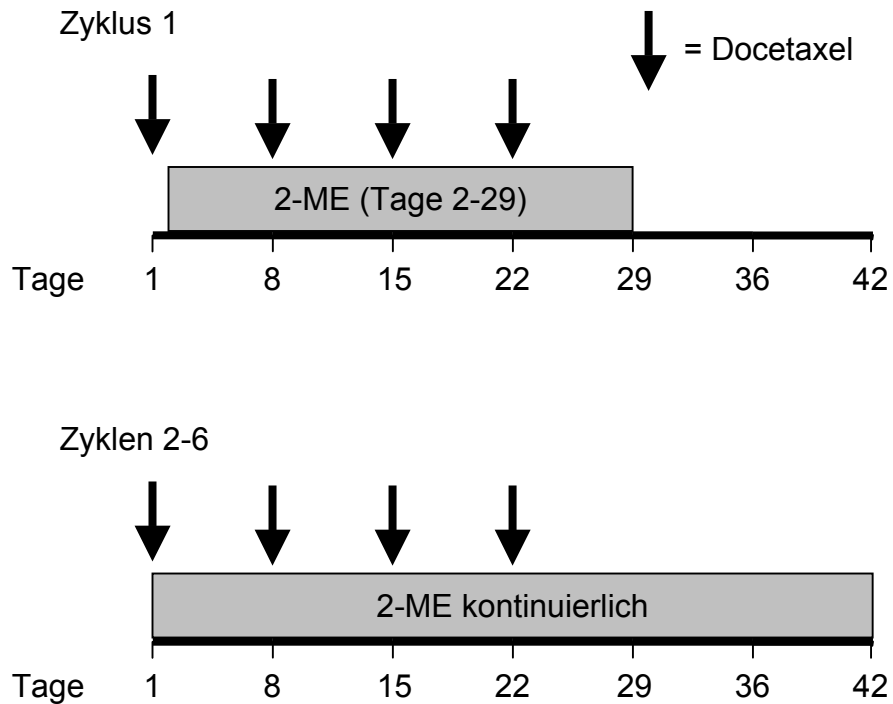


Abbildung 37

Therapieschema der Kombinationsbehandlung aus 2-ME und Docetaxel

#### 5.9.2.3. Beobachtete Nebenwirkungen

Die Nebenwirkungen während der Behandlung waren unterschiedlich stark ausgeprägt. Schwere Nebenwirkungen, die zum Abbruch der Studie führten, kamen nicht vor. Tabelle 10 zeigt die Häufigkeiten der aufgetretenen Nebenwirkungen.

Symptome	Patienten (n)
Müdigkeit	10
Durchfall	6
Übelkeit	5
Haarausfall	6
Hand-Fuß-Syndrom	1
Myalgien	9
Neuropathie	3
Transaminasenanstieg	3
Dyspnoe	7
Andauerndes Tränen	1
Ödeme	2
Anämie	1

Tabelle 10

Beobachtete Nebenwirkungen bei insgesamt 15 Patienten. Praktisch alle der beobachteten Nebenwirkungen sind für Docetaxel bekannt.

#### 5.9.2.4. Metabolismus von 2-ME

Ein ausgedehnter Metabolismus zu 2-ME1 (2-Methoxyestron) und eine Conjugation an Glucuronide und Sulfate wurde durch die Koadministration mit Docetaxel nicht beeinflusst.

2-ME1 macht 80-95% der freien Metabolite aus

Die conjugierte Form macht 90-95% aus

#### 5.9.2.5. Pharmakokinetik von 2-ME

Die Pharmakokinetik von 2-ME zeigt eine große interindividuelle Variabilität.

Die simultane Verabreichung von Docetaxel beeinflusst nicht die pharmakokinetischen Eigenschaften von 2-ME,

Die Serumspiegel steigen bis zu einer Dosis von 600mg pro Tag und bleiben bei höheren Dosen im steady state.

#### 5.9.2.6. Klinische Wirkung auf das Tumorwachstum

Neben der beschriebenen Untersuchungen wurde auch der klinische Effekt auf das Tumorwachstum beurteilt. Tabelle 11 stellt die Responseraten von 10 Patientinnen dar.

<b>Wirkung</b>	<b>Patientinnen (n)</b>
Komplette Response	1 (7%)
Partielle Response	2 (13%)
Stable disease	7 (47%)
Tumorprogression	5 (33%)
Mediane Zeit bis zum Therapieversagen	203 Tage

Tabelle 11

Wirkung der Kombinationstherapie auf das Tumorwachstum

#### 5.9.2.7. Schlußfolgerung

2-ME und Docetaxel werden gut toleriert und verändern nicht gegenseitig die Pharmakokinetik (Über 50% der Patienten zeigten eine Response oder ein stable disease)

Es wurde keinerlei Wirkung auf den normalen Hormonhaushalt gefunden.

Es konnte kein eindeutiger Marker für die Aktivität von 2-ME identifiziert werden.

Diese noch sehr präliminären Studien zeigen, daß 2-ME eine Substanz zu sein scheint, die in der Klinik ihre Indikation findet. Die behandelten Patientinnen hatten alle eine schlechte Ausgangssituation mit metastasierenden Mammakarzinomen. Dennoch wurde nur bei einem Drittel der Patientinnen eine Tumorprogression in der Kombination mit Docetaxel beobachtet. Weitere Kombinationen sollten untersucht werden, z.B. 2-ME mit Gemcitabine kombiniert, was nach unseren Untersuchungen eine additive Wachstumshemmung hat. Auch beim HCC sollte versucht werden, eine klinische Studie zu initiieren, da keine alternative zytostatische Therapie zur Verfügung steht.



## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß der physiologische Östrogenmetabolit 2-Methoxyestradiol (2-ME) eine sehr starke Wachstumshemmung auf Tumorzellen verschiedener solider Tumoren ausübt. Die untersuchten Tumoren sind das hepatozelluläre Karzinom (HCC), das Pankreaskarzinom und das Bronchialkarzinom. Alle drei Tumoren haben eine sehr schlechte Prognose, die sich in den letzten 20 Jahren trotz neuer OP-Techniken und neuer zytostatisch wirkender Substanzen sowie molekularer Therapieansätze nicht wesentlich verbessert hat. Beim HCC und beim Pankreaskarzinom konnten wir durch die Verwendung mehrerer Zelllinien eine Generalisierbarkeit der gefundenen Ergebnisse dokumentieren, denn es kam zu einer dosisabhängigen Wachstumshemmung von bis zu 90% bei allen bis auf eine Pankreaskarzinomzelllinie. Die Wirkung lies sich noch verstärken, indem wir 2-ME beim Pankreaskarzinom mit in der Klinik üblichen Zytostatika wie Gemcitabine, Docetaxel oder einem monoklonalen Antikörper gegen den EGF Rezeptor kombinierten. Wir fanden eine additive Wachstumshemmung in der Kombination mit allen verwendeten Substanzen. Beim Bronchialkarzinom basierten unsere Untersuchungen auf Vorarbeiten, bei denen bereits ein tumorhemmender Effekt durch 2-ME gefunden wurde. Wir kombinierten 2-ME mit Gentherapie. Dazu setzten wir ein Adenovirus, welches das Tumorsuppressorgen p53 exprimiert, ein. Hier konnten wir zeigen, daß das vom Gen des Adenovirus stammende p53 Protein nach systemischer intravenöser Applikation in den Lungenmetastasen exprimiert werden kann. 2-ME stabilisierte dieses p53 Protein, so daß eine ausreichende Menge funktionsfähigen p53 Proteins vorhanden war, um die Tumorzellen zu töten oder im Wachstum zu hemmen. Dies war der erste Bericht über eine erfolgreiche intravenöse Applikation eines adenoviralen Vektors mit einem Tumorsuppressorgen.

2-ME war nicht nur in der Lage, wachstumshemmend auf normale Tumorzellen zu wirken. Wir konnten auch zeigen, daß multiresistente Pankreaskarzinomzellen, die eine bis zu 1000-fach letale Dosis Zytostatika überleben, komplett sensibel gegenüber 2-ME waren. Die Wachstumshemmung durch 2-ME war in diesem Versuch identisch zwischen parentalen sensiblen Zellen und den multiresistenten Zellen. Die  $IC_{50}$  lag hier bei  $0,56\mu M$  bzw bei  $1,65\mu M$  je nachdem, ob das *mdr-1* Gen exprimiert wurde oder nicht. Diese Werte entsprechen in etwa denen, die bei

anderen Tumorzelltypen gefunden wurden. Auch Bronchialkarzinomzellen, die eine Resistenz gegen Cisplatin aufwiesen, zeigten sich ebenfalls komplett sensibel gegenüber 2-ME.

Untersuchungen zur Toxizität von 2-ME zeigten, daß Kulturen von normalen humanen Hepatozyten, die von Leberresektaten gewonnen wurden, die Behandlung mit 2-ME überlebten. In parallelen Versuchen mit HCC Zellen zeigte sich eine signifikante Wachstumshemmung der Tumorzellen. Da die normalen Hepatozyten nicht proliferieren, untersuchten wir proliferierende Hepatozyten, indem wir Leberresektionen bei Mäusen durchführten. In der Leberregenerationssphase behandelten wir die Mäuse mit 2-ME. 2-ME hatte keine nachteilige Wirkung auf die Tiere. Nach Beendigung des Versuches waren die resezierten Lebern fast komplett regeneriert. Immunhistochemische Untersuchungen konnten zeigen, daß die Anzahl der apoptotischen Zellen in der regenerierenden Leber in der mit 2-ME behandelten Gruppe nicht zunahm. Durch eine Färbung mit PCNA konnte die Proliferation der Hepatozyten nach Resektion und damit die Regeneration verdeutlicht werden. Hier war die Proliferationsrate unabhängig von der Behandlung mit 2-ME.

Als wesentlichen Mechanismus der Wachstumshemmung von Tumorzellen durch 2-ME fanden wir die starke Induktion von Apoptose in allen Zellen, bis auf die relativ resistente Pankreaskarzinomzelllinie PaTu 8988s. Mit mehreren Untersuchungstechniken konnten wir die Apoptose nachweisen. Um die Mechanismen der Apoptoseinduktion zu untersuchen, führten wir Western Blot Untersuchungen durch, die Veränderungen des Expressionsmusters apoptosebezogener Proteine aufzeigen sollten. Wir fanden eine Induktion des p53 Proteins in den HCC Zelllinien, die den Wild-Typ p53 exprimieren. Die Pankreaskarzinomzellen waren alle mutiert für das p53 Gen, so daß hier nach 2-ME Behandlung p53 unabhängige Apoptose vorlag. Messungen des p21 Proteins, einem direkten Effektor von p53, zeigte, daß es parallel zu p53 hochreguliert wurde, was darauf schließen läßt, daß das hochregulierte p53 funktionell aktiv ist. In einer Zelllinie (SK-Hep 1) wurde das stärkste Antiapoptoseprotein bcl-2 herunterreguliert, was eine Förderung der Apoptoseinduktion nach sich zieht. Somit führen mehrere Mechanismen zum apoptotischen Zelltod.

Tierversuche an Nacktmäusen zeigten nicht nur, daß 2-ME Tumorzellen töten kann, sondern lassen auch Rückschlüsse für eine klinische Anwendung zu. So konnten wir zeigen, daß subcutane HCC Tumoren zu 55% und Lungenmetastasen von

Pankreaskarzinomen und Bronchialkarzinomen um 59, bzw. 55% im Wachstum gehemmt werden konnten. Die Kombination mit dem p53 tragenden Adenovirus verringerte die Tumormasse um weitere 14%. Die gesamte Tumormasse konnte durch diese Kombination um das 336-fache gegenüber der Kontrollgruppe reduziert werden. Den beschriebenen antiangiogenetischen Effekt konnten wir weder beim Pankreaskarzinom, noch beim Bronchialkarzinom nachvollziehen. Die Tiere zeigten keinerlei klinisch apparente Nebenwirkungen wie Durchfall, Gewichtsverlust, Bewegungsarmut oder anderes. Die Kontrollgruppe der Tiere mit Lungenmetastasen vom Pankreaskarzinom hingegen zeigte eine deutliche Tumorkachexie mit 20%igem Gewichtsverlust im Vergleich zur Therapiegruppe.

Schlußfolgernd ist 2-ME eine Substanz, die von großem klinischen Interesse ist. Durch die hohe Wirksamkeit in vitro und in vivo bei gleichzeitig sehr geringen Nebenwirkungen wird sie derzeit in der Klinik in Phase I/II Studien getestet. Die orale Gabe macht die Durchführung der Therapie ambulant möglich. Kombinationen mit wirksamen zytostatischen Substanzen scheinen die Wirksamkeit bei Gleichbleiben der Nebenwirkungen noch zu verstärken. Besonders interessant scheint die Therapie bei multiresistenten Tumoren, wie sie beim Tumorrezidiv meist vorliegen.

## Literatur

1. Aebi S, Gelber S, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Collins J, Thurlimann B, Rudenstam CM, Lindtner J, Crivellari D, Cortes-Funes H, Simoncini E, Werner ID, Coates AS, Goldhirsch A (2000) Is chemotherapy alone adequate for young women with oestrogen-receptor-positive breast cancer? *Lancet* 27;355(9218):1869-74
2. Amin AM, Creveling CR, Lowe MC. Immunohistochemical localization of Catechol methyl-transferase in normal and cancerous breast tissues of mice and rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 1983; 70(2): 337-342
3. Amorino GP, Freeman ML, Choy H (2000) Enhancement of radiation effects in vitro by the estrogen metabolite 2-methoxyestradiol. *Radiat Res*;153:384-391.
4. Arbiser JL, Panigrathy D, Klauber N, Rupmick M, Flynn E, Udagawa T, D'Amato RJ (1999) The antiangiogenic agents TNP-470 and 2-Methoxyestradiol inhibit the growth of angiosarcoma in mice. *J Am Acad Dermatol*;40 (6Pt1):925-929.
5. Attalla H, Westberg JA, Andersson LC, Adlercreutz H, Makela TP(1998) 2 - Methoxyestradiol-induced phosphorylation of Bcl-2: uncoupling from JNK/SAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun*;247(3):616-9.
6. Attalla H. Mäkelä T.P. Adlercreutz H. Andersson L.C (1996) 2-Methoxyestradiol arrests cells in mitosis without depolymerizing tubulin. *Biochem biophys res comm*;228. 467-473.
7. Banerjeei SK, Zoubine MN, Sarkar DK, Weston AP, Shah JH, Campbell DR (2000) 2-Methoxyestradiol blocks estrogen-induced rat pituitary tumor growth and tumor angiogenesis: possible role of vascular endothelial growth factor. *Anticancer Res.* Jul-Aug;20(4):2641-5.
8. Beham A, Marin MC, Fernandez A, Herrmann J, Brisbay S, Tari AM, Lopez-Berestein G, Lozano G, Sarkiss M, McDonnell TJ. Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene* 1997; 15(23): 2767-2772
9. Berg D, Sonsalla R, Kuss E. Concentrations of 2-methoxyestrogens in human serum measured by a heterologous immunoassay with an <sup>125</sup>I-labelled ligand. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 1983; 103, 282-288
10. Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li GY, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China:

- supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 1993 Sep 15;85(18):1483-92
11. Bookstein R., Demers W, Gregory R., Maneval D., Park J., Wills K. p53 gene therapy in vivo of hepatocellular and liver metastatic colorectal cancer. *Seminars in Oncology* 23 (1): 66-77, 1996
  12. Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21Waf1. *Pathol. Biol. (Paris)* 2000; 48(3): 190-202
  13. Bruix J, Castells A, Bru C. Review: Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. A western perspective. *The Cancer Journal* 1992; 5(1)
  14. Bu S, Blaukat A, Fu X, Heldin NE, Landstrom M. Mechanisms for 2-methoxyestradiol-induced apoptosis of prostate cancer cells. *FEBS Lett* 2002 Nov 6;531(2):141-51
  15. Budhram-Mahadeo V, Morris PJ, Smith MD, Midgley CA, Boxer LM, Latchman DS. P53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *Biol. Chem.* 1999; 274(21): 15237-15244
  16. Carbone DP, Mitsudomi T, Chiba I, Piantadosi S, Rusch V, Nowak JA, McIntire D, Slamon D, Gazdar A, Minna J. p53 immunostaining positivity is associated with reduced survival and is imperfectly correlated with gene mutations in resected non-small cell lung cancer. A preliminary report of LCSG 871. *Chest* 1994 Dec;106(6 Suppl):377S-381S.
  17. Carothers AM, Hughes SA, Ortega D, Bertagnolli MM. 2-Methoxyestradiol induces p53-associated apoptosis of colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 2002 Dec 10;187(1-2):77-86.
  18. Cassidy J, Bissett D, Spence Obe RAJ. Eds. *Oxford Handbook of Oncology*. Oxford University Press Inc. New York. 2002.
  19. Chauhan D, Catley L, Hideshima T, Li G, Leblanc R, Gupta D, Sattler M, Richardson P, Schlossman RL, Podar K, Weller E, Munshi N, Anderson KC. 2-Methoxyestradiol overcomes drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood* 2002 Sep 15;100(6):2187-94
  20. Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. P53 levels, functional domains and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* 1996; 10: 2438-2451

21. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H, et al. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Oncogene* 1990 Oct;5(10):1603-10
22. Choi SW, Hytioglou P, Geller SA, Kim SM, Chung KW, Park DH, Theise ND, Thung SN. The expression of p53 antigen in primary malignant epithelial tumors of the liver: an immunohistological study. *Liver* 1993; 13: 172-176
23. Cristiano R.J., Bo X., Nguyen D., Schumacher G., Kataoka M., Spitz F.R., Roth J.A. Viral and nonviral gene delivery vectors for cancer gene therapy. *Cancer Detection and prevention*. 22(5): 445-454 (1998)
24. Curtin NJ, Harris AL, James OF, Bassendine MF. Inhibition of growth of human hepatocellular carcinoma in vitro and in athymic mice by a quinazoline inhibitor of thymidylate synthase, CB3717. *Br. J. Cancer* 1986; 53(3): 361-368
25. Cushman M, He HM, Katzenellenbogen JA, Lin CM, Hamel E (1995) Synthesis, antitubulin and antimitotic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site. *J Med Chem*. Jun 9;38(12):2041-9.
26. D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E. 2- Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; Vol. 91: 3964-3968
27. Dawling S, Roodi N, Mernaugh RL, Wang X, Parl FF. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res* 2001 Sep 15;61(18):6716-22
28. Dillman RO. Monoclonal antibodies for treating cancer. *Ann Intern Med* 1989 Oct 1;111(7):592-603
29. Dingli D, Timm M, Russell SJ, Witzig TE, Rajkumar SV. Promising preclinical activity of 2-methoxyestradiol in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2002 Dec;8(12):3948-54
30. Divgi CR, Welt S, Kris M, Real FX, Yeh SD, Gralla R, Merchant B, Schweighart S, Unger M, Larson SM, et al. Phase I and imaging trial of indium 111-labeled

- anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1991 Jan 16;83(2):97-104.
31. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981 Jun;66(6):1191-308
  32. Dubey RK, Gillespie DG, Keller PJ, Imthurn B, Zacharia LC, Jackson EK. Role of methoxyestradiols in the growth inhibitory effects of estradiol on human glomerular mesangial cells. *Hypertension* 2002 Feb;39(2 Pt 2):418-24
  33. Dunn JF (1983) Transport of estrogens in human plasma. In: G.R. Merriam and M.B. Lipsett (eds.), *Catechol Estrogens* 167-176. New York: Raven Press.
  34. El-Naggar AK. *The Cancer Journal* 1992: 5(6)
  35. Feigelson HS, Henderson BE (1996) Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*. Nov;17(11):2279-84. Review. No abstract available.
  36. Feitelson MA. Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 1998: 5(4): 367-374
  37. Fiel MI, Min A, Gerber MA, Faire B, Schwartz M, Thung SN. Hepatocellular carcinoma in long-term oral contraceptive use. *Liver* 1996: 16: 372-376
  38. Fotsis T., Zhang Y., Pepper M.S., Adlercreutz H., Montesano R., Nawroth P.P., Schweigerer L (1994) The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Nature*;368: 237-239.
  39. Gelbke HP, Knuppen R (1976) The excretion of five different 2-hydroxyoestrogen monomethyl ethers in human pregnancy urine. *J Steroid Biochem*; 7:457-463.
  40. Gilliam AD, Watson SA. Emerging biological therapies for pancreatic carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2002 Jun;28(4):370-8
  41. Ginsberg RJ, Vokes EE, Raben A. Non small cell lung cancer. Aus: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer, Principles and practice of oncology*. 1997; 5<sup>th</sup> edition Lippincott-Raven 858-911.
  42. Golab J, Nowis D, Skrzycki M, Czczot H, Baranczyk-Kuzma A, Wilczynski GM, Makowski M, Mroz P, Kozar K, Kaminski R, Jalili A, Kopec' M, Grzela T, Jakobisiak M. Antitumor Effects of Photodynamic Therapy Are Potentiated by 2-Methoxyestradiol. A SUPEROXIDE DISMUTASE INHIBITOR. *J Biol Chem* 2003 Jan 3;278(1):407-14

43. Golebiewska J, Rozwadowski P, Spodnik JH, Knap N, Wakabayashi T, Wozniak M. Dual effect of 2-methoxyestradiol on cell cycle events in human osteosarcoma 143B cells. *Acta Biochim Pol* 2002;49(1):59-65
44. Guinn BA, Padua RA. Review: p53 A role in the initiation and progression of leukemia? *Cancer Journal* 1997; 8: No. 4
45. Hahn EG, Gauss-Muller V, Hornberger M, Kalbfleisch H, Deinhardt F. Solid tumours of human primary hepatocellular carcinoma cell-lines in hypothyroid mice: a model for biochemical and therapeutic studies (author's transl). *Z. Gastroenterol.* 1982; 20(3): 168-173
46. Hamada K, Alemany R, Zhang W.W, Hittelman W.N, Lotan R, Roth J.A, Mitchell M.F. Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *Cancer Research.* 56(13):3047-3054, (1996).
47. Hamel E, Lin CM, Flynn E, D'Amato RJ (1996) Interactions of 2-methoxyestradiol, an endogeneous mammalian metabolite, with unpolymerized tubulin and with tubulin polymers. *Biochemistry*; 35:1304-1310.
48. Hayashi H, Sugio K, Matsumata T, Adachi E, Urata K, Tanaka S, Sugimachi K. The mutation of codon 249 in the p53 gene is not specific in Japanese hepatocellular carcinoma. *Liver* 1993; 13: 279-281
49. Heise C, Sampson-Johannes A., Williams A, McCormack F, Von Hoff DD and Kirn DH, ONYX-015, an E1B gene attenuated adenovirus, causes tumour-specific cytolysis and antitumoural efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Medicine* 3 6 (1997), pp. 639–645.
50. Heng-Liang L, Liu TY, Chi CW. The effect of 2-methoxyestradiol on cell cycle distribution, caspase activation and DNA fragmentation in gastric cancer cells [Abstract] *Proc. Am. Assoc. Cancer Res* 2000;41; 5233: 824.
51. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* 2000 Sep 21;407(6802):390-5
52. Huober JB, Nakamura S, Meyn R, Roth JA, Mukhopadhyay T. Oral administration of an estrogen metabolite-induced potentiation of radiation antitumor effects in presence of wild-type p53 in non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000 Nov 1;48(4):1127-37



53. Jacobs AD. Gemcitabine-based therapy in pancreas cancer: gemcitabine-docetaxel and other novel combinations. *Cancer* 2002 Aug 15;95(4 Suppl):923-7.
54. Kagawa S, Fujiwara T, Hizuta A, Yasuda T, Zhang WW, Roth JA, Tanaka N. P53 expression overcomes p21WAF1/CIP1-mediated G1 arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* 1997; 15(16): 1903-1909
55. Kang KH, Kim WH, Choi KH. P21 promotes ceramide-induced apoptosis and antagonizes the antideath effect of bcl-2 in human hepatocarcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 1999; 253(2): 403-412
56. Kataoka M, Schumacher G, Cristiano RJ, Atkinson EN, Roth JA, Mukhopadhyay T. An agent that increases tumor suppressor transgene product coupled with systemic transgene delivery inhibits growth of metastatic lung cancer in vivo. *Cancer Res* 1998;58(21):4761-5.
57. Kawakami K, Tsukuda M, Mizuno H, Nishimura G, Ishii A, Hamajima K. Alteration of the bcl-2/bax status of head and neck cancer cell lines by chemotherapeutic agents. *Anticancer Res.* 1999; 19(5B): 3972-3932
58. Kinuya S, Kawashima A, Yokoyama K, Kudo M, Kasahara Y, Watanabe N, Shuke N, Bunko H, Michigishi T, Tonami N Anti-angiogenic therapy and radioimmunotherapy in colon cancer xenografts. *Eur J Nucl Med* 2001 Sep;28(9):1306-12
59. Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ (1997) Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res.* Jan 1;57(1):81-6
60. Kliche KO, Hoffken K (1999) The role of apoptosis in hematologic malignancies and modulation of apoptosis as a new therapeutic approach. *J Cancer Res Clin Oncol.*;125(3-4):226-31.
61. Knudson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and bax protein function independently to regulate cell death. *Nat. Genet.* 1997; 16(4): 358-363
62. Kumar AP, Garcia GE, Slaga TJ. 2-methoxyestradiol blocks cell-cycle progression at G(2)/M phase and inhibits growth of human prostate cancer cells. *Mol Carcinog* 2001 Jul;31(3):111-24
63. Lane DP, Crawford LV. T-antigen is bound to host protein in SV 40 transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263

64. LaVallee TM, Zhan XH, Herbstritt CJ, Kough EC, Green SJ, Pribluda VS. 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res* 2002 Jul 1;62(13):3691-7
65. Lewin: Genes, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1998.
66. Lin HL, Liu TY, Chau GY, Chi CW. Comparison of 2-methoxyestradiol-induced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species. *Cancer* 2000; 89(5): 983-994
67. Lin HL, Liu TY, Wu CW, Chi CW. 2-Methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G(2)/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells. *Cancer* 2001 Aug 1;92(3):500-9
68. Lippert C, Seeger H, Mueck AO. The effect of endogenous estradiol metabolites on the proliferation of human breast cancer cells. *Life Sci* 2003 Jan 10;72(8):877-83.
69. Lippert TH, Seeger H, Mueck AO. The significance of estrogen metabolism for hormone-dependent neoplasms from the clinical-pharmacological viewpoint. *Arzneimittelforschung* 1999; 49(8): 649-662
70. Lottering ML, Haag M, Seegers JC (1992) Effects of 17 beta-estradiol metabolites on cell cycle events in MCF-7 cells. *Cancer Res.* Nov 1;52(21):5926-32.
71. Lui W, Lin H, Chau G, Liu T, Chi C (2000) Male predominance in hepatocellular carcinoma: new insight and a possible therapeutic alternative. *Med Hypotheses.* Oct;55(4):348-350.
72. Mack TM, Pike MC, Henderson BE, Pfeiffer RI, Gerkins VR, Arthur M, Brown SE (1976) Estrogens and endometrial cancer in a retirement community. *N Engl J Med.* Jun 3;294(23):1262-7.
73. Maran A, Zhang M, Kennedy AM, Sibonga JD, Rickard DJ, Spelsberg TC, Turner RT. 2-methoxyestradiol induces interferon gene expression and apoptosis in osteosarcoma cells. *Bone* 2002 Feb;30(2):393-8
74. Martucci CP, Fishman J (1993) P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol Ther.* Feb-Mar;57(2-3):237-57. Review.
75. McCormick DL, Johnson WD, Pribluda VS, Green SJ, Tomaszewski JE, Smith AC (2000) Preclinical development of 2-methoxyestradiol (2ME2, NSC-659853). [Abstract] *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*;41; 2080: 328.

76. McDonald TW, Annegers JF, O'Fallon WM, Dockerty MB, Malkasian GD Jr, Kurland LT (1977) Exogenous estrogen and endometrial carcinoma: case-control and incidence study. *Am J Obstet Gynecol.* Mar 15;127(6):572-80.
77. McDonnell TJ, Marin MC, Hsu B, Brisbay SM, McConnell K, Tu SM, Campbell ML, Rodriguez-Villanueva J. The bcl-2 oncogene: apoptosis and neoplasia. *Radiat. Res.* 1993; 136(3): 307-312
78. McGinn CJ, Lawrence TS, Zalupski MM. On the development of gemcitabine-based chemoradiotherapy regimens in pancreatic cancer. *Cancer* 2002 Aug 15;95(4 Suppl):933-40
79. Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001 Mar;8(1):3-9
80. Merriam GR, MacLusky NJ, Picard MK, Naftolin F. Comparative properties of the catechol estrogens, I: Methylation by catechol-o-methyltransferase and binding to cytosol estrogen receptors. *Steroids* 1980; 36(1): 1-11
81. Miller KD, Murry DJ, Curry E, Haney LG, McClaskey N, Storniolo AM, Phillips E, Pribluda V, Gubish ER, Sledge GW Jr. A phase I study of 2-methoxyestradiol (2ME2) plus docetaxel (D) in patients (pts) with metastatic breast cancer (MBC) Annual meeting of the American Association of Clinical Oncology 2002 May 18-21, Abstract No: 442 Category: Phase I Trials Orlando, FL, USA
82. Mukhopadhyay T, Roth JA. Induction of apoptosis in human lung cancer cell after wild-type p53 activation by methoxyestradiol. *Oncogene* 1997; 14: 379-384
83. Mukhopadhyay T, Roth JA. Superinduction of wild-type p53 protein after 2-methoxyestradiol treatment of Ad5p53-transduced cells induces tumor cell apoptosis. *Oncogene* 1998; 17(2): 241-246
84. Nakagawa-Yagi Y, Ogane N, Inoki Y, Kitoh N (1996) The endogenous estrogen metabolite 2-methoxyestradiol induces apoptotic neuronal cell death in vitro. *Life Sci*;58(17):1461-7
85. Negro F, Papotti M, Pacchioni D, Galimi F, Bonino F, Bussolati G. Detection of human androgen receptor mRNA in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization. *Liver* 1994; 14: 213-219
86. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Buchler MW; European Study Group for Pancreatic Cancer. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in

- resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001 Nov 10;358(9293):1565-6.
87. Nielsen L.L., Gurnani M., Syed J., Dell J., Hartman B., Cartwright M., Johnson R.C. Recombinant E1-deleted adenovirus-mediated gene therapy for cancer – efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models. *Human gene therapy* 9(5): 681-694 (1998)
  88. Parkin DM, Pisani P, Lopez AD, Masuyer E. At least one in seven cases of cancer is caused by smoking. Global estimates for 1985. *Int J Cancer* 1994 Nov 15;59(4):494-504
  89. Peters M, Blinn G, Jostock T, Schirmacher P, Meyer zum Buschenfelde KH, Galle PR, Rose-John S. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology* 2000 Dec;119(6):1663-71
  90. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF (1993) Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.*;15(1):17-35. Review. No abstract available
  91. Poutanen M, Isomaa V, Peltoketo H, Vihko R (1995) Regulation of oestrogen action: role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Ann Med.* Dec;27(6):675-82. Review.
  92. Pribluda VS, Green SJ (1998) A good estrogen. *Science*;280:987-988.
  93. Pritchard KI (2000) Current and future directions in medical therapy for breast carcinoma: endocrine treatment. *Cancer* Jun 15;88(12 Suppl):3065-72
  94. Qadan LR, Perez-Stable CM, Anderson C, D'Ippolito G, Herron A, Howard GA, Roos BA. 2-Methoxyestradiol induces G2/M arrest and apoptosis in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Aug 3;285(5):1259-66
  95. Qanungo S, Basu A, Das M, Haldar S. 2-Methoxyestradiol induces mitochondria dependent apoptotic signaling in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2002 Jun 13;21(26):4149-57
  96. Reiser F, Way D, Bernas M, Witte M, Witte C (1998) Inhibition of normal and experimental angiotumor endothelial cell proliferation and cell cycle progression by 2-methoxyestradiol. *Proc Soc Exp Biol Med*;219(3):211-216.
  97. Ries L, Hankey B, Miller B, Hartman A, Edwards B, eds. Cancer statistics review 1973-1988. Bethesda: National Cancer Institute, 1991: Table VI-21.

98. Robinson MR, Baffi J, Yuan P, Sung C, Byrnes G, Cox TA, Csaky KG. Safety and pharmacokinetics of intravitreal 2-methoxyestradiol implants in normal rabbit and pharmacodynamics in a rat model of choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 2002 Feb;74(2):309-17
99. Rosenberg L. Pancreatic cancer: a review of emerging therapies. *Drugs* 2000 May;59(5):1071-89
100. Roth J.A. Modification of tumor suppressor gene expression and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) with an adenovirus vector expressing wild-type p53 and cisplatin. *Human Gene Therapy*. 7(8):1013-1030, (1996)
101. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996 Sep;2(9):985-91
102. Runnebaum I.R., Hawighorst T, Möbus V.J., Kreienberg R., Schering-Plough Ovarian Cancer Clinical Study Group. Adenovirally mediated p53 gene therapy in a phase I trial for ovarian cancer: From bench to bedside. *J Cancer Res Clin Oncol* 124 (Suppl) R48: 12.08.01 (1998)
103. Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C, Orazem J, Zaman M, Hoda S, McIntosh J, Kurie J, Dmitrovsky E. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* 1993 May 15;53(10 Suppl):2379-85
104. Schoniger-Hekele M, Muller C, Kutilek M, Oesterreicher C, Ferenc P, Gangl A. Hepatocellular carcinoma in Central Europe: prognostic features and survival. *Gut* 2001; 48(1): 103-109
105. Schumacher G, Bruckheimer EM, Beham AW, Honda T, Brisbay S, Roth JA, Logothetis C, McDonnell TJ. Molecular determinants of cell death induction following adenovirus-mediated gene transfer of wild-type p53 in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* 2001; 91(2): 159-66
106. Schumacher G, Kataoka M, Roth JA, Mukhopadhyay T (1999) Potent antitumor activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res*;5(3):493-9.

107. Schumacher G, Scheunert S, Nuessler A.K, Weber A, Mueller A, Platz K.P, Mukhopadhyay T, Neuhaus P. 2-Methoxyestradiol inhibits tumor growth and induces apoptosis in human hepatoma cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* (2000) 4909: 772–773.
108. Schwartz JD, Schwartz M, Mandeli J, Sung M. Neoadjuvant and adjuvant therapy for resectable hepatocellular carcinoma: review of the randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 2002 Oct;3(10):593-603
109. Seegers JC, Aveling ML, Van Aswegen CH, Cross M, Koch F, Joubert WS (1989) The cytotoxic effects of estradiol-17 beta, catecholestradiols and methoxyestradiols on dividing MCF-7 and HeLa cells. *J Steroid Biochem.* Jun;32(6):797-809
110. Seegers JC, Lottering ML, Grobler CJ, van Papendorp DH, Habbersett RC, Shou Y, Lehnert BE (1997) The mammalian metabolite, 2-methoxyestradiol, affects P53 levels and apoptosis induction in transformed cells but not in normal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Jul;62(4):253-67.
111. Slebos R, Kibbelaar R, Dalesio O. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323: 561.
112. Sledge GW Jr., Miller KD, Haney LG, Nguyen DD, Storniolo AM, Phillips EN, Pribluda V, Gubish ER, A phase I study of 2-methoxyestradiol (2ME2) in patients (pts) with refractory metastatic breast cancer. Annual meeting of the American Association of Clinical Oncology (ASCO) 2002, May 18-21, Abstract No: 441 Category: Phase I Trials. Orlando, FL, USA
113. Spitz F.R. Nguyen D. Skibber J.M. Meyn R.E. Cristiano R.J. Roth J.A. Adenoviral-mediated wild-type p53 gene expression sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation. *Clinical Cancer Research.* 2(10):1665-1671, (1996).
114. Steegenga WT, van der Eb AJ, Jochemsen AG. How phosphorylation regulates the activity of p53. *J. Mol. Biol.* 1996: 263(2): 103-13
115. Strom SC, Dorko K, Thompson MT, Pisarov LA, Nussler AK. (1993) Large scale isolation and culture of human hepatocytes. In: Franco D., Boudjema K., Varet B, eds. *Ilots de Langerhans et hépatocytes. Vers une utilisation thérapeutique.* Chapter 17. Les Editions Inserm: 195-205.
116. Stuver SO. Towards global control of liver cancer ? *Seminars in Cancer Biology* 1997 :8(4): 299-306

117. Sweeney CJ, Miller KD, Sissons SE, Nozaki S, Heilman DK, Shen J, Sledge GW Jr. The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors. *Cancer Res* 2001 Apr 15;61(8):3369-72.
118. Swisher SG, Roth JA. Clinical update of Ad-p53 gene therapy for lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2002 Jul;11(3):521-35.
119. Tang ZY. Hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 15: 1-7
120. Tsukamoto A, Kaneko Y, Yoshida T, Han K, Ichinose M, Kimura S. 2-Methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen, enhances apoptosis and beta-galactosidase expression in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 9: 248(1): 9-12.
121. Tsutsui T, Tamura Y, Hagiwara M, Miyachi T, Hikiba H, Kubo C, Barrett JC (2000) Induction of mammalian cell transformation and genotoxicity by 2-methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen. *Carcinogenesis.* Apr;21(4):735-40.
122. Turner RT, Evans GL. 2-Methoxyestradiol inhibits longitudinal bone growth in normal female rats. *Calcif. Tissue Int.* 2000; 66(6): 465-469.
123. Verdier-Pinard P, Wang Z, Mohanakrishnan AK, Cushman M, Hamel E (2000) A steroid derivative with paclitaxel-like effects on tubulin polymerization. *Mol Pharmacol*;57:568-575.
124. Wang SH, Myc A, Koenig RJ, Bretz JD, Arscott PL, Baker JR. 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces thyroid cell apoptosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000; 165(1-2): 163-172.
125. Wassberg E (1999) Angiostatic treatment of neuroblastoma. *Ups J Med Sci*;104:1-24.
126. Weber A, Wahn U, Renz H. Superantigen-induced T cell death by apoptosis: analysis on a single cell level and effect of IFN- $\gamma$  and IL-4 treatment. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2000; 12: 215-223.
127. WHO World Health Report: Mortality Database Germany 1997
128. Yu MC, Yuan JM, Govindarajan S, Ross RK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Can. J. Gastroenterol.* 2000; 14(8): 703-709
129. Yue TL, Wang X, Loudon CS, Gupta S, Pillarisetti K, Gu JL, Hart TK, Lysko PG, Feuerstein GZ. 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite,

- induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: possible role for stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas expression. *Mol Pharmacol.* 1997;51(6):951-62.
130. Zhu BT, Conney AH (1998) Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Res.* Jun 1;58(11):2269-77. Review.
131. Ziel HK, Finkle WD (1975) Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. *N Engl J Med.* Dec 4;293(23):1167-70.
132. Zoubine MN, Weston AP, Johnson DC, Campbell DR, Banerjee SK (1999) 2-methoxyestradiol-induced growth suppression and lethality in estrogen-responsive MCF-7 cells may be mediated by down regulation of p34cdc2 and cyclin B1 expression. *Int J Oncol.* Oct;15(4):639-46.



## **Danksagung**

Mein tiefster Dank gilt Herrn Professor Dr. Peter Neuhaus für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und der Möglichkeit, diese Arbeit zu realisieren. Dies beinhaltet einen Forschungsaufenthalt im MD Anderson Cancer Center in Houston, Texas, USA, sowie der zur Verfügungstellung von Laborräumen und den nötigen Mitteln. Schließlich danke ich ihm für die kritische Überarbeitung der fertiggestellten Arbeit und für zahlreiche stimulierende Gespräche und Anregungen.

Dr. Jack A. Roth als Direktor des Department für Thoracic- and Cardiovascular Surgery im MD Anderson Cancer Center in Houston, Texas, USA danke ich herzlich für die Möglichkeit, in seinem Labor Teile dieser Arbeit erfolgreich durchzuführen. Durch den Assistant Professor Dr. Tapas Mukhopadhyay konnte ich hierdurch die notwendigen Techniken erlernen, die dann weiter eingesetzt wurden.

Weiterhin danke ich den Doktoranden Sylvia Scheunert und Daniel Baumunk für die erfolgreiche Durchführung von Teilaspekten dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Andreas Nüssler danke ich für die Bereitstellung der humanen Hepatozytenkulturen als Kontrollgruppen, sowie für stimulierende Gespräche und.

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....

Datum

.....

Unterschrift